

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie

Studijní obor: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Kristýna Zavadilová

Úloha fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinázy PPK-1 v regulaci signální dráhy proteinu Wnt
u *Caenorhabditis elegans*

The role of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase PPK-1 in Wnt signalling regulation
in *Caenorhabditis elegans*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Marie Macůrková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.8.2021

Podpis

Tímto bych ráda poděkovala především své školitelce Mgr. Marii Macůrkové, Ph.D. za vstřícnost, cenné rady a odbornou pomoc bez níž by tato práce nevznikla. Také bych ráda poděkovala členům Laboratoře molekulární genetiky vývoje na Univerzitě Karlově v Praze, zejména Mgr. Jitce Velčevové a Mgr. Filipu Knopovi za pomoc a rady při experimentech, a dále RNDr. Lence Libusové, Ph.D. a Mgr. Lence Doubravské, Ph.D. za spolutvoření příjemného pracovního prostředí. Poděkování patří i mé rodině a přátelům za podporu při psaní této diplomové práce.

Abstrakt

Signální dráha proteinu Wnt je velmi konzervovanou signalizací napříč Eukaryoty, jež reguluje mnoho buněčných procesů. Její aktivita je nezbytná zejména během vývoje jedince, ale je důležitá i v pozdější fázi života, kdy se podílí na udržení homeostáze v těle. Recentní studie ukázaly, že do regulace kanonické signální kaskády Wnt je zapojena i fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kináza (PIP5K), která je klíčová pro tvorbu fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfátu v buňce. U savčích buněk byl dokonce popsán model, v kterém se PIP5K účastní transdukce signálu v buňce přijímající signál Wnt. Rozhodli jsme se ověřit zapojení PIP5K v regulaci signalizace Wnt i u *Caenorhabditis elegans*, které je skvělým modelovým organismem pro studium signálních drah, a přispět tak k lepšímu porozumění této evolučně konzervované dráhy.

V této práci jsme zjistili, že snížená exprese PPK-1/PIP5K u jedinců divokého typu nevede k chybné signalizaci Wnt. Nicméně v podmínkách, kde je již narušena aktivita dráhy Wnt, vede snížení exprese PPK-1 k defektní migraci dceřiné buňky neuroblastu QL. Analýzou migrace potomků QL, jež je kontrolována signalizací Wnt závislou na EGL-20/Wnt, jsme odhalili genetické interakce *ppk-1* s některými členy této dráhy. Také jsme pozorovali vliv PPK-1 na signalizaci Wnt, která je řízena LIN-44/Wnt, jež reguluje polaritu buněk. Bohužel jsme nebyli schopni stanovit mechanismus, kterým PPK-1 ovlivňuje signální dráhu proteinu Wnt u *Caenorhabditis elegans*.

Klíčová slova:

Caenorhabditis elegans, Wnt, PIP5K, PPK-1, migrace QL, EGL-20, LIN-44

Abstract

The Wnt signalling pathway is highly conserved signalling among Eukaryotes that regulates many cellular processes. In particular, it plays a role during individual's development, but it is also important at later stage of life, when it is involved in maintaining homeostasis in the body. Recent studies have shown that phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K), which is key to the production of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate in the cell, is also involved in regulation of the canonical Wnt signalling cascade. In mammalian cells, a model has been described in which PIP5K is involved in signal transduction in a Wnt receiving cell. We decided to verify the involvement of PIP5K in the regulation of Wnt signalling also in *Caenorhabditis elegans*, an excellent model organism for study of signalling pathways, and thus contribute to a better understanding of this evolutionarily conserved pathway.

In this work, we found that decreased expression of PPK-1/PIP5K in wild type animals does not result in Wnt signalling disruption. Nevertheless, in conditions, where the activity of Wnt signalling is already reduced, decrease in PPK-1 levels leads to defective migration of the QL neuroblast daughter cell. By analyzing the migration of QL progeny, which is controlled by EGL-20/Wnt dependent Wnt signalling, we revealed the genetic interactions of *ppk-1* with some members of this pathway. We also observed the effect of PPK-1 on Wnt signalling dependent on LIN-44/Wnt, which regulates cell polarity. Unfortunately, we were unable to establish the mechanism by which PPK-1 regulates the Wnt signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*.

Key words:

Caenorhabditis elegans, Wnt, PIP5K, PPK-1, QL migration, EGL-20, LIN-44

Obsah

Seznam zkratk.....	1
1. Teoretický úvod	3
1.1. Signální dráha proteinu Wnt.....	3
1.1.1. Nekanonické signální dráhy Wnt	3
1.1.2. Kanonická signální dráha Wnt	4
1.2. Průběh kanonické signální dráhy proteinu Wnt.....	5
1.2.1. Buňka produkující signál Wnt.....	6
1.2.2. Transport Wnt	9
1.2.3. Buňka přijímající signál Wnt	10
1.3. Signální dráha proteinu Wnt u <i>C. elegans</i>	11
1.3.1. Migrace neuroblastů Q	14
1.4. Fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináza.....	15
1.5. PPK-1.....	18
2. Cíle.....	20
3. Materiály a metody	21
3.1. Kmeny	21
3.1.1. Bakteriální kmeny	21
3.1.2. Kmeny a transgeny <i>C. elegans</i>	21
3.2. Kultivace <i>C. elegans</i>	22
3.2.1. Kultivační média	22
3.2.2. Příprava agarových misek s NGM	22
3.2.3. Purifikace znečištěných misek s <i>C. elegans</i>	23
3.3. Experimenty s RNAi	23
3.4. Příprava linií pomocí mikroinjekce	24
3.5. Příprava plazmidů pro mikroinjekce	25
3.5.1. Použité vektory a primery	25
3.5.2. Klonování – obecný postup.....	27
3.5.2.1. Amplifikace fragmentů DNA pro klonování	27
3.5.2.2. Gibsonova ligace.....	27
3.5.2.3. Bakteriální transformace	28
3.5.2.4. Izolace plazmidů a jejich precipitace	28

3.6.	Vektory pro tkáňově specifickou nadprodukci PPK-1	29
3.7.	AID systém	30
3.7.1.	Příprava linie nesoucí <i>wrt-2p::TIR1</i>	31
3.7.2.	Příprava <i>ppk-1</i> sgRNA	32
3.7.3.	Příprava plazmidu pJW1583- <i>ppk-1</i>	32
3.7.4.	Transkripce <i>ppk-1</i> sgRNA <i>in vitro</i>	34
3.7.5.	Indukce degradace proteinů auxinem	35
3.8.	Mikroskopie	35
3.8.1.	Příprava hád'átek pro mikroskopii	35
3.8.2.	Analýza fenotypu QL	36
3.8.3.	Polarita axonů ALM a PLM neuronů	36
3.8.4.	DiI barvení	37
3.9.	Ostatní	37
3.9.1.	Separace fragmentů DNA po PCR	37
3.9.2.	Mražení kmenů <i>C. elegans</i>	38
3.9.3.	Roztoky	38
4.	Výsledky	39
4.1.	Genetické interakce <i>ppk-1</i> s komponenty signální dráhy Wnt	39
4.2.	Tkáňově specifická nadprodukce PPK-1	41
4.3.	Tkáňově specifická degradace PPK-1	45
4.3.1.	Exprese TIR1 v přijímajících buňkách	45
4.3.2.	Linie nesoucí <i>ppk-1::AID</i>	46
4.4.	Časná polarizace a migrace neuroblastu QL	48
4.5.	Vliv PPK-1 na polaritu axonů ALM a PLM neuronů	50
4.6.	Vliv PPK-1 na asymetrické dělení buňky T	51
5.	Diskuze	53
5.1.	Genetické interakce <i>ppk-1</i> se členy signální dráhy proteinu Wnt	53
5.2.	Stanovení vlivu PPK-1 na regulaci signální dráhy proteinu Wnt	56
5.3.	Vliv PPK-1 na časnou polarizaci a migraci neuroblastu QL	60
5.4.	Působení PPK-1 na ostatní ligandy Wnt u <i>C. elegans</i>	61
6.	Závěr	63
7.	Seznam literatury	64

Seznam zkratek

AID	Degron indukovatelný auxinem	<u>A</u> uxin <u>i</u> nducible <u>d</u> egron
AMER1	Protein 1 rekrutující APC k membráně	<u>A</u> PC <u>m</u> embrane <u>r</u> ecruitment protein <u>1</u>
ANTH	Doména rozpoznávající PI(4,5)P2	<u>A</u> P180 <u>N</u> - <u>T</u> erminal <u>H</u> omology
AP-2	Adaptorový protein 2	<u>A</u> daptor protein <u>2</u>
APC	Protein střevní adenomatózní polypózy	<u>A</u> denomatous <u>p</u> olyposis <u>c</u> oli
ALM	Senzorický neuron u <i>C. elegans</i>	<u>A</u> nterior <u>l</u> ateral <u>m</u> icrotubule cell
AVM	Mechano-senzorický neuron u <i>C. elegans</i>	<u>A</u> nterior <u>v</u> entral <u>m</u> icrotubule cell
BAR	Doména sloužící k dimerizaci proteinů	<u>B</u> in/ <u>a</u> mphiphysin/ <u>R</u> vs <u>1</u>
BAR-1	Ortolog pro savčí β -katenin u <i>C. elegans</i>	<u>B</u> eta-catenin/ <u>A</u> rmadillo <u>r</u> elated <u>1</u>
Cas9	Protein 9 spojovaný s metodou CRISPR	<u>C</u> RISPR <u>a</u> ssociated protein <u>9</u>
CRISPR	Segmenty pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice	<u>C</u> lustered <u>r</u> egularly <u>i</u> nterspaced <u>s</u> hort <u>p</u> alindromic <u>r</u> epeats
CK1	Kasein kináza 1	<u>C</u> asein <u>k</u> inase <u>1</u>
CWN-1	Ortolog pro savčí Wnt u <i>C. elegans</i>	<u>C. elegans</u> <u>W</u> nt family <u>1</u>
CWN-2	Ortolog pro savčí Wnt u <i>C. elegans</i>	<u>C. elegans</u> <u>W</u> nt family <u>2</u>
DEP	Doména proteinu Dvl	<u>D</u> ishevelled, <u>E</u> GL-10, <u>P</u> leckstrin
DIC	Kontrastní mikroskopie s diferenciální interferencí	<u>D</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> ontrast <u>M</u> icroscopy
DIX	Doména proteinu Dvl	<u>D</u> ishevelled, <u>A</u> xin
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát	<u>D</u> eoxynucleotide <u>t</u> riphosphate
DPY-19	Transmembránový protein u <i>C. elegans</i>	<u>C</u> -mannosyltransferase <u>d</u> umpy <u>19</u>
dsRNA	Dvouvláknová RNA	<u>D</u> ouble-stranded <u>R</u> NA
Dvl	Protein Dishvelled	<u>D</u> ishevelled
EGF	Epidermální růstový faktor	<u>E</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
EGL-20	Ortolog pro savčí Wnt u <i>C. elegans</i>	<u>E</u> gg <u>l</u> aying <u>d</u> efective <u>20</u>
ENTH	Doména rozpoznávající PI(4,5)P2	<u>E</u> psin <u>N</u> - <u>T</u> erminal <u>H</u> omology
ER	Endoplazmatické retikulum	<u>E</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum
FERM	Doména rozpoznávající PI(4,5)P2	<u>4.1</u> protein, <u>E</u> zrin, <u>R</u> adix, <u>M</u> oesin
Fz	Protein Frizzled	<u>F</u> rizzled
GA	Golgiho aparát	<u>G</u> olgi <u>a</u> pparatus
GFP	Zelený fluorescenční protein	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GSK3 β	Glykogen syntáza kináza 3 β	<u>G</u> lucogen <u>s</u> ynthase <u>k</u> inase <u>3</u> β
HMP-2	Ortolog pro savčí β -katenin u <i>C. elegans</i>	<u>H</u> umpback <u>2</u>
HR	Homologní ramena	<u>H</u> omology <u>a</u> rms
IP3	Inositoltrisfosfát	<u>I</u> nositol <u>t</u> risphosphate
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid	<u>I</u> sopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Médium Luria-Bertani	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
L1-L4	Larvální stádium 1-4	<u>L</u> arval stage <u>1-4</u>
LEF	Vazebný faktor pro lymfoidní enhancery	<u>L</u> ymphoid <u>e</u> nhancer-binding <u>f</u> actor
LIN-44	Ortolog pro savčí Wnt u <i>C. elegans</i>	<u>A</u> bnormal cell <u>l</u> ineage <u>44</u>
LRP5/6	Protein příbuzný receptoru s nízkou hustotou	<u>L</u> ow density lipoprotein <u>r</u> eceptor-related protein <u>5/6</u>
MAB-5	Ortolog pro savčí HOX6a u <i>C. elegans</i>	<u>M</u> ale <u>a</u> bnormal <u>5</u>
MIG-5	Ortolog pro savčí Dvl u <i>C. elegans</i>	<u>A</u> bnormal cell <u>m</u> igration <u>5</u>
MIG-14	Ortolog pro savčí Wls u <i>C. elegans</i>	<u>A</u> bnormal cell <u>m</u> igration <u>14</u>
MIG-21	Transmembránový protein u <i>C. elegans</i>	<u>A</u> bnormal cell <u>m</u> igration <u>21</u>

MOM-2	Ortolog pro savčí Wnt u <i>C. elegans</i>	<u>More of MS 2</u>
MTM	PI(3)P fosfatáza z rodiny myotubularinů	<u>Myotubularin related protein</u>
NGM	Růstové médium pro kultivaci <i>C. elegans</i>	<u>Nematode growth medium</u>
PCP	Typ nekanonické signální dráhy Wnt	<u>Planar cell polarity</u>
PCR	Polymerázová řetězová reakce	<u>Polymerase chain reaction</u>
PDGF	Růstový faktor z destiček	<u>Platelet derived growth factor</u>
PDZ	Doména proteinu Dvl	<u>Post-synaptic density protein-95, Disc large tumor suppressor, Zonula occludens-1</u>
PH	Plekstrin homologický	<u>Pleckstrin homology</u>
PI	Fosfatidylinositol	<u>Phosphatidylinositol</u>
PI(3)P	Fosfatidylinositol (3)-fosfát	<u>Phosphatidylinositol 3-phosphate</u>
PI(4)P	Fosfatidylinositol (4)-fosfát	<u>Phosphatidylinositol 4-phosphate</u>
PI(4,5)P2	Fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfát	<u>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</u>
PIP5K	Fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kináza	<u>Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase</u>
POP-1	Ortolog pro TCF u <i>C. elegans</i>	<u>Posterior pharynx defect 1</u>
PPK-1	Ortolog pro PIP5K u <i>C. elegans</i>	<u>PIP Kinase 1</u>
PLM	Senzorický neuron u <i>C. elegans</i>	<u>Posterior lateral microtubule cell</u>
PVM	Mechano-senzorický neuron u <i>C. elegans</i>	<u>Posterior ventral microtubule cell</u>
PX	Phox homologický	<u>Phox homology</u>
QL	Levý neuroblast Q	<u>Left Q neuroblast</u>
QR	Pravý neuroblast Q	<u>Right Q neuroblast</u>
RFP	Červený fluorescenční protein	<u>Red fluorescent protein</u>
RNAi	RNA interference	<u>RNA interference</u>
ROR2	Jaderný receptor pro transkripční faktory	<u>Receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2</u>
RRF-3	RNA dependentní RNA polymeráza 3 u <i>C. elegans</i>	<u>RNA dependent RNA polymerase family 3</u>
RYK	Receptor příbuzný tyrozinovým kinázám	<u>Receptor tyrosine kinase</u>
SEC	Selekční kazeta	<u>Selection cassette</u>
SEL-5	Ortolog pro savčí kinázu AAK1 u <i>C. elegans</i>	<u>Suppresor/enhancer of LIN-12 5</u>
SFRP	Sekretované proteiny příbuzné Frizzled	<u>Secreted Frizzled related proteins</u>
sgRNA	Naváděcí RNA	<u>Single guide RNA</u>
siRNA	Malá interferující RNA	<u>Small interfering RNA</u>
SNX	Protein retromerového komplexu	<u>Sorting nexin</u>
SWIM	Sekretovaná molekula interagující s Wls	<u>Secreted Wingless-interacting molecule</u>
SYS-1	Ortolog pro savčí β -katenin u <i>C. elegans</i>	<u>Symmetrical sister cell hermaphrodite gonad defect 1</u>
TCF	Specifický transkripční faktor pro T-buňky	<u>T-cell specific transcription factor</u>
TIR1	Protein reagující na inhibitor transportu	<u>Transport inhibitor response 1</u>
UNC-40	Receptor u <i>C. elegans</i>	<u>Uncoordinated 40</u>
VPS	Protein retromerového komplexu	<u>Vacuolar protein sorting</u>
WIF	Inhibiční faktor proteinu Wnt	<u>Wnt inhibitory factor</u>
Wls	Protein Wntless	<u>Wntless</u>
WT	Divoký laboratorní typ	<u>Wild type</u>
WRM-1	Ortolog pro savčí β -katenin u <i>C. elegans</i>	<u>Worm armadillo 1</u>

1. Teoretický úvod

1.1. Signální dráha proteinu Wnt

Signální dráha proteinu Wnt je důležitou signalizací napříč živočichy (Loh *et al.*, 2016), jejíž význam spočívá především v regulaci embryonálního vývoje jedince. Podílí se na regulaci mnoha buněčných procesů, ať už se jedná o utváření tělních os, buněčnou diferenciaci, proliferaci nebo udržení homeostáze v těle (shrnutí Logan & Nusse, 2004). Není proto překvapivé, že narušení aktivity této dráhy může vést k vážným patologiím, jako jsou různá degenerativní onemocnění, mezi něž patří například abnormality v hustotě kostí, ve vývoji zubů a sítnice nebo dědičná osteoporóza. Defektní průběh signalizace Wnt rovněž velmi často vede ke vzniku nádorů. Díky studiu nádorově transformovaných buněk se také podařilo některé komponenty signální dráhy Wnt objevit (shrnutí Nusse & Clevers, 2017). Nejznámějším takovým proteinem je pravděpodobně APC, který byl identifikován z karcinomu tlustého střeva, jež se označuje jako syndrom familiární adenomatózní polypózy (Kinzler *et al.*, 1991; Nishisho *et al.*, 1991).

Pojmenování dráhy vzniklo spojením dvou názvů homologních genů pro polaritu segmentu – wg (Wingless) objevený u *Drosophila melanogaster* (Cabrera *et al.*, 1987) a *int-1* (Integration 1) popsáný u obratlovců (Rijsewijk *et al.*, 1987). Název signální dráha Wnt může být někdy zavádějící, protože se pod ním ve skutečnosti skrývá několik drah. Z historického hlediska můžeme signální dráhy Wnt rozdělit do dvou skupin. První skupina využívá během transdukce signálu β -katenin a v této práci ji budu označovat jako kanonickou signální dráhu Wnt. Naopak druhá skupina není závislá na β -kateninu, zahrnuje více různých drah a tuto skupinu budu nazývat nekanonickou.

1.1.1. Nekanonické signální dráhy Wnt

Dosud bylo identifikováno několik typů nekanonické signalizace Wnt, přičemž nejznámější a nejlépe popsané jsou dráhy Wnt/PCP a Wnt/ Ca^{2+} (shrnutí Komiyama & Habas, 2008). Dráha Wnt/PCP má zásadní vliv na zprostředkování změn v cytoskeletární organizaci. Tento proces je nezbytný pro polarizaci a pohyb buněk, což se uplatňuje především v regulaci gastrulačních pohybů (shrnutí Mlodzik, 2002). Naopak dráha Wnt/ Ca^{2+} kontroluje intracelulární hladiny vápníku a podílí se na určení dorzo-ventrální polarity nebo na formování různých orgánů (shrnutí Komiyama & Habas, 2008).

Přestože tyto nekanonické dráhy nevyužívají k přenosu signálu β -katenin, řada dalších regulačních proteinů je shodná s níže popsanou kanonickou dráhou. Jedná se hlavně o proteiny

účastníci se iniciální fáze transdukce signálu v buňce přijímající signál Wnt. Jak kanonická, tak nekanonická dráha je zahájena vazbou ligandu Wnt na transmembránový receptor Frizzled (Fz) (Bhanot *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2000). Nicméně u kanonické dráhy se na vazbě proteinu Wnt podílí současně s Fz i koreceptor LRP5/6, zatímco nekanonická skupina tento koreceptor nevyužívá. Namísto tohoto proteinu se u některých nekanonických drah účastní vazby Wnt jiné receptory, například proteiny RYK (Lu *et al.*, 2004) nebo ROR2 (Nishita *et al.*, 2006).

Kromě receptoru Fz je dalším společným znakem účast proteinu Dishevelled (Dvl) v transdukci signálu (Klingensmith *et al.*, 1994). Stavba tohoto proteinu je vysoce konzervovaná napříč živočichy. Skládá se ze tří domén – na N-konci se nachází doména DIX, následuje centrální doména PDZ a C-koncová doména DEP. Je zajímavé, že právě tyto domény zajišťují variabilitu v přenosu signálu v buňkách přijímajících signál Wnt, neboť každá signální dráha proteinu Wnt interaguje s rozdílnou kombinací těchto tří domén, což vede k aktivaci odlišných signálních kaskád (Axelrod *et al.*, 1998; shrnuto Habas & Dawid, 2005). Například doména PDZ se účastní jak kanonické, tak nekanonické dráhy prostřednictvím interakce s cytoplazmatickou částí transmembránového receptoru Fz (Wong *et al.*, 2003). Doména DIX hraje roli hlavně v kanonické signalizaci, kdy je zásadní pro vytvoření komplexu Wnt-Fz-LRP5/6-Dvl a vazbu Dvl na Axin (Kishida *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2008). Naopak doména DEP reguluje spíše nekanonické dráhy, například Wnt/PCP, kde je nezbytná pro lokalizaci Dvl k membráně, kde tento protein může interagovat s dalšími komponenty této dráhy (Axelrod *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2004).

I když je signální dráha proteinu Wnt velmi konzervovaná, je také velmi komplikovaná. Navíc nesmíme opomenout, že často neexistují striktní hranice mezi jednotlivými typy signalizace Wnt, a tudíž se jejich vlivy na určitý buněčný děj mohou prolínat. Nicméně vzhledem k tomu, že experimentální část práce se zabývala zejména kanonickou signalizací, v další části textu jsem se zaměřila pouze na signální dráhu Wnt řízenou β -kateninem.

1.1.2. Kanonická signální dráha Wnt

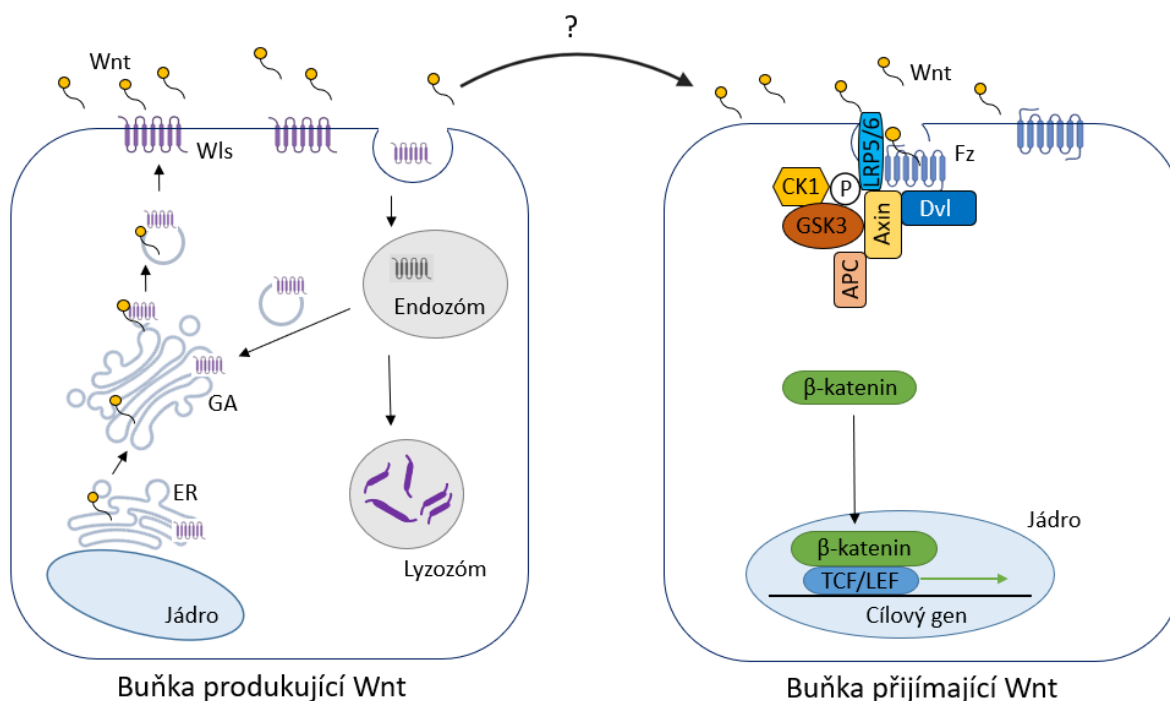
Jak je zmíněno výše, hlavním rozdílem mezi oběma skupinami je závislost na β -kateninu. Kateniny jsou buněčné proteiny, které se podílejí na tvorbě adhezivních spojů mezi dvěma buňkami. β -katenin slouží jako spojovací článek mezi cytoskeletem buňky a adhezivními molekulami, konkrétně kadheriny. β -katenin je totiž schopný se přímo vázat na cytoplazmatický konec kadherinu (Huber *et al.*, 2001), ale zároveň se na něho váže α -katenin (Pokutta & Weis, 2000), který interaguje s aktinem (Pokutta *et al.*, 2002).

Kromě této funkce β -katenin rovněž působí jako transkripční faktor a účastní se přenosu signálu v buňce přijímající signál Wnt. Zásadním dějem kanonické signalizace Wnt je regulace stability tohoto proteinu. Pokud není přítomen signál Wnt, je cytoplazmatický β -katenin degradován v důsledku interakce s destrukčním komplexem. Naopak pokud dojde k vazbě ligandu Wnt na receptor přijímající buňky, spustí se signální kaskáda, v které je nejdříve inhibován destrukční komplex, čímž je zabráněna degradace β -kateninu. Ten se díky tomu může hromadit v cytoplazmě a je poté schopen vstoupit do jádra. V něm následně spolupracuje s dalšími transkripčními faktory patřícími do rodiny TCF/LEF, což má za následek expresi cílových genů, mezi něž patří například protein důležitý pro buněčné dělení – cyklinD nebo protein regulující proliferaci – Myc (shrnutí Routledge & Scholpp, 2019).

Tato dráha je pravděpodobně nejvíce známá pro své zapojení v určení dorzo-ventrální a antero-posteriorní tělní osy u mnoha organismů. Taktéž se podílí na morfogenezi některých tkání během embryonálního vývoje. Avšak je důležitá i během dospělého období, kdy se podílí na obnově tkání mezi něž patří například střevo, žaludek, játra či kůže a mléčná žláza (shrnutí Steinhart & Angers, 2018).

1.2. Průběh kanonické signální dráhy proteinu Wnt

V porovnání s nekanonickými drahami je kanonická dráha studována a také je lépe prozkoumaná její regulace. Současný pohled na tuto dráhu se ji snaží vnímat v širším kontextu, tedy nejen jako samotnou signální kaskádu, ale tak, že existují dvě populace buněk, mezi nimiž dochází k transportu proteinů Wnt. Regulace signální dráhy Wnt tudíž probíhá ve třech úrovních. První fáze zahrnuje procesy, které vedou k uvolnění molekul Wnt z produkující buňky. Následuje transport ligandů Wnt z této buňky k buňce, která váže Wnt. Posledním krokem je zahájení signální kaskády v buňce přijímající signál Wnt, jež ústí v expresi cílových genů (Obr. 1) (shrnutí Routledge & Scholpp, 2019).



Obrázek 1. Schématické znázornění průběhu kanonické signální dráhy proteinu Wnt. Syntéza a maturace proteinu Wnt probíhá v buňce, která se označuje jako buňka produkující signál Wnt (buňka vlevo). V této fázi je Wnt modifikován v ER a následně sekretován pomocí proteinu Wntless (Wls). Poté je Wnt transportován dosud neznámým mechanismem extracelulárním prostředím k buňce, jenž má receptor pro ligand Wnt (buňka vpravo). Vazbou Wnt na Fz-LRP5/6 je aktivována signální kaskáda, která nejdříve inhibuje destrukční komplex, což následně vede ke stabilizaci β -kateninu, který translokuje do jádra a napomáhá transkripci cílového genu. Vytvořeno podle současného pohledu na kanonickou dráhu Wnt (shrnutí Routledge & Scholpp, 2019).

1.2.1. Buňka produkující signál Wnt

Proteiny Wnt jsou sekretované glykoproteiny bohaté na cystein. Bylo identifikováno 13 rodin proteinu Wnt (Wnt1-11, Wnt16 a WntA). Nicméně jejich zastoupení u jednotlivých živočišných druhů je velmi variabilní (Routledge & Scholpp, 2019). Například *Drosophila*, jenž slouží jako modelový organismus pro bezobratlé, obsahuje proteiny ze 7 rodin proteinu Wnt, zatímco myš nebo člověk má zastoupení hned z 12 rodin (shrnutí Miller, 2001). Navíc díky dvěma historickým duplikacím celého genomu, se počet genů pro Wnt u některých organismů navýšil. Například myši a lidé tím získali 19 genů pro Wnt (Miller, 2001) a *Danio rerio* jich má dokonce 27 (Duncan *et al.*, 2015). Třebaže existuje taková různorodost v zastoupení rodin Wnt u odlišných druhů, z evolučního hlediska lze najít některé společné znaky pro jednotlivé fylogenetické linie. Prvoústí se vyznačují absencí rodiny Wnt3, a naopak u druhoústých dosud nebyl objeven zástupce z rodiny WntA (Routledge & Scholpp, 2019).

Syntéza proteinů Wnt a jejich maturace probíhá v endoplazmatickém retikulu (ER), kde dochází k posttranslačním modifikacím proteinů Wnt. Jednou z nich je N-glykosylace, která

slouží k rozlišení různých ligandů Wnt a je důležitá pro jejich signální aktivitu (Komekado *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2013). Obzvláště důležitou modifikací je acylace serinového zbytku acyltransferázou vázanou na membránu – Porcupine (Kadowaki *et al.*, 1996). Bylo pozorováno, že narušená aktivita proteinu Porcupine vede k defektní sekreci Wnt, jelikož je Wnt zadržen už v ER (Takada *et al.*, 2006). Pokud však dojde k přenosu acylové skupiny na Wnt, je umožněna interakce Wnt s transmembránovým proteinem Wntless (Wls), který ho transportuje na povrch buňky, kde dojde k jeho uvolnění do extracelulárního prostředí (Herr & Basler, 2012). Recentní studie dokonce navrhla model, v kterém palmitoylace Wnt proteinem Porcupine a následná vazba tohoto modifikovaného Wnt na Wls jsou klíčové pro stabilizaci Wls a inhibici degradační dráhy spojené s ER, která by jinak vedla k degradaci Wls (Glaeser *et al.*, 2018).

Aby mohla probíhat efektivní sekrece Wnt, je nezbytné regulovat potřebné množství Wls v buňce produkující Wnt. Důležitým regulačním krokem je tedy i následná recyklace Wls z plazmatické membrány zpět do buňky. Tento děj je evolučně konzervovaný, což jen podtrhuje jeho význam v sekreci Wnt (Belenkaya *et al.*, 2008; Franch-Marro *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008a; Port *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). U háďátka a octomilky bylo ukázáno, že internalizace Wls z povrchu buňky je závislá na adaptorovém proteinu 2 (AP-2). Narušená aktivita AP-2 totiž způsobí zadržení Wls na plazmatické membráně, což způsobí sníženou sekreci Wnt (Pan *et al.*, 2008a; Port *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Stejný fenotyp byl pozorován u savčích buněk v případě narušení funkce klatrinu a dynaminu (Gasnereau *et al.*, 2011). Všechny tyto proteiny se podílejí na endocytóze zprostředkované klatrinem, jenž je zahájena vazbou jedné z podjednotek proteinu AP-2 na plazmatickou membránu v místech obohacených na fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfát (PI(4,5)P2). Vazba způsobí konformační změnu v proteinu AP-2, který je tak schopen vázat klatrin potřebný pro tvorbu váčku obsahujícího daný náklad (Krauss *et al.*, 2006). Po dokončení klatrinového obalu je zapotřebí váček odštěpit z plazmatické membrány. To má na starost jeden z enzymů patřící do rodiny malých GTPáz – dynamin, který je rekrutován do místa vzniku váčku, kde je vázán na plazmatickou membránu prostřednictvím své PH domény (Achiriloaie *et al.*, 1999). Následně ještě dojde k disociaci klatrinového obalu z váčku, čehož se především účastní protein Hsc70 a jeho kofaktor auxilin (Ungewickell *et al.*, 1995). Takto vytvořený váček s nákladem nakonec putuje do časného endozómu. Model, v kterém je internalizace Wls kontrolována endocytózou zprostředkovanou klatrinem, podporuje nález konzervovaného motivu pro tento typ endocytózy – YXX ϕ , jenž byl identifikován v intracelulární části proteinu Wls, konkrétně na jeho třetí smyčce. Tento motiv slouží jako endocytický signál pro rozeznání proteinem AP-2 a pokud byl tento motiv u Wls mutován, došlo k vadné sekreci Wnt (Gasnereau *et al.*, 2011).

V časném endozómu potom Wls čekají dva možné osudy. První možností je transport Wls z časného endozómu do pozdního endozómu, který následně splyne s lyzozómem. Ten obsahuje hydrolytické enzymy, čímž dojde k degradaci Wls. Avšak pokud je aktivní retromerový komplex, je Wls retromerem transportován z časného endozómu do Golgiho aparátu (GA) (Belenkaya *et al.*, 2008) a odtud do ER, kde se může znovu navázat na nově syntetizované ligandy Wnt (Yu *et al.*, 2014). S tímto modelem jsou v souladu studie, které pozorovaly, že v případě narušení některé z komponent retromerového komplexu, došlo k degradaci Wls v lyzozómu, čímž se snížila sekrece Wnt (Belenkaya *et al.*, 2008; Franch-Marro *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008a; Port *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008).

Klasický retromerový komplex se u savců skládá ze tří hlavních proteinů – VPS26, VPS29, VPS35, které slouží k rozpoznání nákladu, a alespoň jednoho proteinu z rodiny SNX, který slouží k transportu a třídění nákladu retromeru (shrnutí Gallon & Cullen, 2015). Jádro retromerového komplexu pravděpodobně tvoří podjednotka VPS35, jelikož je schopna vázat všechny ostatní podjednotky retromeru. Na N-koncovou oblast VPS35 se váže VPS26, na C-koncovou oblast VPS29 a SNX se na VPS35 váže přes doménu PX (Haft *et al.*, 2000). Bylo popsáno, že proteinem, který rozeznává Wls a přímo se na něj váže, je právě podjednotka VPS35 (Belenkaya *et al.*, 2008). Ovšem dochází k vazbě i mezi ostatními podjednotkami, například mezi VPS26 a VPS29, ale tyto interakce pravděpodobně podporují stabilitu komplexu (Haft *et al.*, 2000).

Rozhodnutí, zda bude Wls recyklován nebo degradován, je ovlivněno množstvím jednoho z fosfoinositidů na endozomální membráně, konkrétně množstvím fosfatidylinositol 3-fosfátu (PI(3)P). Vysoké hladiny PI(3)P na povrchu časných endozómů jsou zajištěny kinázami z rodiny PI3K (fosfatidylinositol 3-kinázy), jenž fosforylují fosfatidylinositol (PI) na 3-OH pozici inositolového kruhu za vzniku PI(3)P (Gillooly *et al.*, 2000; Burda *et al.*, 2002). Naopak komplex fosfatáz z rodiny myotubularinů (MTM-6/MTM-9) defosforyluje PI(3)P zpět na PI, což negativně ovlivňuje recyklaci Wls (Silhankova *et al.*, 2010).

Vazba retromerového komplexu na endozómy je zprostředkována proteiny z rodiny SNX. Pro tuto rodinu je typická výše zmíněná doména PX interagující s fosfoinositidem PI(3)P na endozomální membráně (Yu & Lemmon, 2001). Typické komponenty retromerového komplexu – SNX1/SNX2 nebo SNX5/SNX6 také obsahují doménu BAR sloužící k dimerizaci SNX, k deformaci membrány a utvoření membránových tubulů, které slouží k následnému transportu do GA (shrnutí Cullen, 2008). Nicméně bylo ukázáno, že hlavním zástupcem z této rodiny, který se podílí na recyklaci Wls, je SNX3 (Harterink *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011),

který ovšem postrádá doménu BAR a proto není jasné, jakým mechanismem dochází k transportu do GA během recyklace Wls.

1.2.2. Transport Wnt

Dalším důležitým krokem je transport proteinů Wnt od buňky produkující Wnt k buňce přijímající. Proteiny Wnt mohou být sekretovány autokrinním nebo parakrinním způsobem (Logan & Nusse, 2004). Mohou tak utvářet gradienty a působit jako morfogeny, které určují chování okolních buněk, například tak, že exprimují určitý gen důležitý pro diferenciaci nebo proliferaci, jak bylo zmíněno výše (viz 1.1.2.). Nicméně způsob, jakým se Wnt uvolní z proteinu Wls a je dále transportován, je stále nejasný. Jednoduchá difúze modifikovaných proteinů Wnt se zdá být nepravděpodobná, jelikož jsou proteiny Wnt hydrofóbní. K vysvětlení šíření ligandů Wnt na velké vzdálenosti bylo navrženo několik mechanismů. V zásadě se jedná o různé způsoby ochrany hydrofóbních skupin, čímž dojde k jejich stabilizaci a ulehčení transportu v extracelulárním prostředí bohatém na vodu (shrnutí Routledge & Scholpp, 2019).

Jeden z takových modelů předpokládá využití částic schopných transportu hydrofóbních lipidů a proteinů na dlouhou vzdálenost, ať už jsou to lipoproteiny (Greco *et al.*, 2001; Panáková *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2019) nebo membránou obalené exozómy (Korkut *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2012). U octomilky byla popsána molekula s podobnými vlastnostmi ovlivňující transport Wnt. Tento protein byl pojmenován SWIM a interaguje s Wnt pravděpodobně vazbou na palmitátovou skupinu, čímž ji odstiňuje od okolního prostředí a tím napomáhá k rozpustnosti Wnt v extracelulárním prostředí a usnadňuje tak jeho transport na delší vzdálenosti (Mulligan *et al.*, 2012). Avšak u obratlovců dosud nebyl identifikován homolog pro tento protein.

Dalším zvažovaným modelem je stabilizace proteinů Wnt heparansulfátem, jenž se vyskytuje ve formě proteoglykanu a je součástí extracelulární matrix. Předpokládá se, že tento polysacharid je schopen vazby na ligand a slouží jako koreceptor pro vazbu ligandu s jeho receptorem, dokonce bylo ukázáno, že heparansulfát interaguje s mnoha morfogeny mezi něž patří i Wnt (shrnutí Kirkpatrick & Selleck, 2007). Například syndecan je schopen vazby na Wnt, čímž reguluje signalizaci Wnt u hád'átka nebo savčích buněk (Alexander *et al.*, 2000; Sundararajan *et al.*, 2015; Saied-Santiago *et al.*, 2017). Navíc bylo popsáno, že by heparansulfát mohl mít roli i v endocytóze lipoproteinů v cílových buňkách, kde by sloužil jako receptor.

Na transport Wnt a šíření jeho gradientu by mohly mít neočekávaně vliv i proteiny SFRP, které jsou považovány za inhibitory proteinů Wnt (Leyns *et al.*, 1997). Nicméně bylo ukázáno, že SFRP mohou i pozitivně regulovat transport Wnt v závislosti na koncentraci a buněčném kontextu (Mii & Taira, 2009; Xavier *et al.*, 2014).

Další atraktivní teorií je transport Wnt prostřednictvím cytoném, což jsou specializovaná filopodia schopná přenosu signálních molekul mezi sousedními buňkami (Ramírez-Weber & Kornberg, 1999). Tento potenciální mechanismus transportu Wnt je nejvíce studován u obratlovců. U embryí modelových organismů *Danio rerio* a *Xenopus* byly proteiny Wnt pozorovány v buněčných výběžcích (Holzer *et al.*, 2012; Luz *et al.*, 2014). Jiná studie na modelovém organismu *Danio rerio* dokonce potvrdila transport Wnt8a skrz tato aktinová filopodia během gastrulace. V buňce produkující signál Wnt jsou proteiny Wnt nahromaděny v membránovém výběžku. Po interakci těchto filopodií s buňkou přijímající signál Wnt jsou cytonémy odříznuty a Wnt8a zůstane připojen na membráně buňky přijímající signál Wnt (Stanganello *et al.*, 2015).

Nicméně všechny popsané mechanismy jsou zatím málo prozkoumané a jedná se o ojedinělé příklady. Dosavadní poznatky naznačují, že v závislosti na buněčném kontextu či studovaném organismu mohou být využity rozdílné formy transportu. Také by se mohlo jednat o různé kombinace nebo dokonce o zatím nepopsaný způsob transportu.

1.2.3. Buňka přijímající signál Wnt

Ať už se jedná o jakýkoliv způsob transportu molekul Wnt mezi buňkami, posledním nezbytným krokem je transdukce signálu v buňce, která váže ligand Wnt. Pro tuto signální kaskádu je zásadní regulace množství β -kateninu. Při absenci proteinů Wnt je udržována nízká hladina β -kateninu v cytoplazmě díky aktivitě destrukčního komplexu. Ten je zodpovědný za fosforylaci β -kateninu na jeho N-konci (Winston *et al.*, 1999). Takto označený β -katenin je rozpoznán E3 ubikvitin ligázou β -TrCP a následně degradován v proteazómu (Hart *et al.*, 1999). Destrukční komplex, jenž je odpovědný za iniciační podnět k degradaci, se skládá ze dvou strukturních proteinů – APC (Rubinfeld *et al.*, 1993) a Axinu (Behrens *et al.*, 1998; Hart *et al.*, 1998), a dále dvou kináz – CK1 α (Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002) a GSK3 β (Rubinfeld *et al.*, 1996).

Pokud dojde k vazbě ligandu Wnt na receptor Fz a koreceptor LRP5/6, jež se nacházejí na povrchu přijímající buňky, zahájí se signální kaskáda, která vede ke stabilizaci β -kateninu. Fz patří do rodiny receptorů spřaženými s proteinem G skládající se ze sedmi transmembránových alfa-helixových domén (Barnes *et al.*, 1998). Extracelulární část Fz obsahuje doménu bohatou na cystein, přes kterou se váže ligand Wnt (Povelones & Nusse, 2005), kdežto intracelulární část je důležitá pro utvoření signalozómu. LRP5/6 je protein s jednou transmembránovou doménou, jehož extracelulární část se také účastní vazby Wnt (Chen *et al.*, 2011), zatímco

intracelulární doména obsahuje pět fosforylačních motivů (PPPSP) důležitých pro pozdější fázi přenosu signálu (Tamai *et al.*, 2004).

Počáteční interakce ligandu a receptorů aktivuje protein Dvl (Krasnow *et al.*, 1995), který se váže na intracelulární doménu Fz (Tauriello *et al.*, 2012). Dvl následně rekrutuje destrukční komplex k membráně skrz Axin (Schwarz-Romond *et al.*, 2007), čímž ho inhibuje, a tím pádem se může nahromaděný nefosforylovaný β -katenin translokovat do jádra. V něm se nachází transkripční faktory z rodiny TCF/LEF, které jsou ale inhibovány represorem Groucho (Cavallo *et al.*, 1998). Na proteiny TCF/LEF se naváže β -katenin, což umožní rekrutování dalších koaktivátorů jako například proteinů remodelujících chromatin (Mosimann *et al.*, 2009). Zároveň dojde k ubikvitinaci proteinu Groucho, což vede k jeho degradaci a tím je tento represor inhibován (Flack *et al.*, 2017). Výsledkem je zahájení transkripce cílových genů. Současně s popsanou transdukcí signálu dojde k fosforylaci intracelulární domény receptoru LRP5/6 (Tamai *et al.*, 2004) prostřednictvím GSK3 β z destrukčního komplexu a CK1 γ , jež je permanentně lokalizována na membráně (Davidson *et al.*, 2005). Tímto způsobem je podporován aktivní stav celé signální kaskády.

Způsobů, které vedou k ukončení nebo potlačení signalizace, je hned několik. Proteiny Wnt jsou inhibovány například již zmíněnými SFRP, které stejně jako receptor Fz obsahují doménu bohatou na cystein schopnou vázat proteiny Wnt (Leyns *et al.*, 1997). Dalším inhibitorem, který brání interakci Wnt s receptory na přijímající buňce, jsou proteiny WIF, které jsou schopny také přímé vazby na proteiny Wnt (Hsieh *et al.*, 1999). Častým mechanismem je regulace prostřednictvím proteinu, k jehož expresi došlo právě díky aktivní kanonické dráze Wnt. Takovým příkladem je Dickkopf-1, který soutěží s proteiny Wnt o vazebné místo na LRP5/6 (Bafico *et al.*, 2001). Dalším příkladem je exprese ubikvitin ligáz Rnf43 a Znf3, které označí Fz, jenž je následně endocytován a degradován v proteazómu (Koo *et al.*, 2012). Cílovým genem kanonické dráhy Wnt je rovněž *Axin2*, jehož protein má stejné vlastnosti jako Axin1 z destrukčního komplexu (Chia & Costantini, 2005). Transkripce Axinu2 způsobí zvýšené hladiny Axinu v cytoplazmě, vedoucí k výstavbě destrukčního komplexu, který se opět může podílet na fosforylaci β -kateninu a tím jeho degradaci (Lustig *et al.*, 2002).

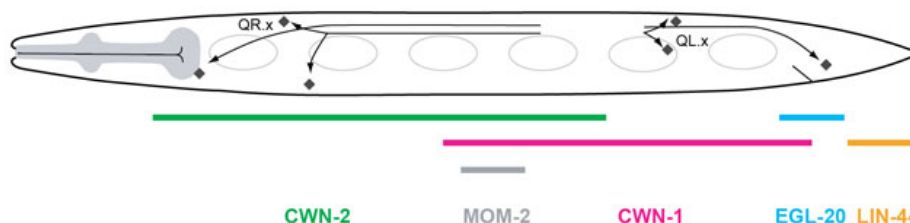
1.3. Signální dráha proteinu Wnt u *C. elegans*

V této práci je signální dráha proteinu Wnt studována u modelového organismu *Caenorhabditis elegans* (hád'átka obecné), které patří mezi Nematoda (hlístice). Hád'átka je sice od obratlovců fyziologicky odlišné, ale signální dráhy, jež řídí vývoj jedince, jsou evolučně konzervované. Velkou výhodou tohoto organismu je determinovaný vývoj, který ústí v přesně

daný počet buněk. Osud každé jednotlivé buňky v těle byl popsán, a hád'átko tak slouží jako vhodný model pro studium právě signálních drah, neboť chybnou signalizaci lze snadno rozpoznat například díky změně osudu buňky přijímající signál. Mezi další výhody *C. elegans* patří krátký životní cyklus, během něhož ale vyprodukuje velké množství potomků. Také kultivace hád'átek je poměrně snadná a málo nákladná oproti jiným modelovým organismům. Navíc jsou u něho snadno proveditelné některé molekulární metody jako je například RNA interference (RNAi) nebo transgeneze, a díky své velikosti a průhlednému tělu je hád'átko vhodné pro různé mikroskopické metody (shrnutí Nigon & Félix, 2017).

Signální dráha Wnt se u *C. elegans* zapojuje do asymetrického dělení buněk, jejich proliferace, polarizace a migrace. Genom obsahuje homology pro všechny hlavní savčí komponenty účastnící se signalizace Wnt závislé na β -kateninu s jedinou výjimkou. Dosud nebyl identifikován gen, který by kódoval LRP5/6 (shrnutí Sawa & Korswagen, 2013). Třebaže byly objeveny některé proteiny s podobnou funkcí, u žádného nebyla pozorována spojitost se signalizací Wnt.

Je důležité zmínit, že genom *C. elegans* kóduje pět homologů pro protein Wnt – *cwn-1*, *cwn-2*, *egl-20*, *mom-2* a *lin-44*. Během časného larválního vývoje jsou všechny zmíněné geny exprimovány podél antero-posteriorní osy. CWN-2 je exprimován v přední části těla, a to v hltanu, svalových buňkách a ve střevě. Směrem k posterioru je následně exprimován CWN-1 ve svalových buňkách a některých buňkách dělohy a vulvy. Dalším proteinem Wnt je EGL-20 jenž je exprimován v buňkách lokalizovaných v oblasti rekta. V ocasní části hád'átka je v hypodermálních buňkách exprimován LIN-44 a poslední protein MOM-2 je z velké části exprimován v zárodečných buňkách. Tímto způsobem se utvoří překrývající se oblasti gradientu Wnt a působení signalizace je tak pokryto v celé délce těla *C. elegans* (Obr. 2) (shrnutí Sawa & Korswagen, 2013).



Obrázek 2. Schématické zobrazení exprese všech homologů pro protein Wnt u *C. elegans*. EGL-20, CWN-1, CWN-2, MOM-2, LIN-44 jsou exprimovány v různých buňkách těla a utváří tak překrývající se oblasti exprese podél celé antero-posteriorní osy. Převzato z (Middelkoop & Korswagen, 2014).

Na rozdíl od obratlovců genom *C. elegans* kóduje pouze jeden homolog pro TCF/LEF (POP-1) (Lin *et al.*, 1995), ale na druhou stranu je *C. elegans* výjimkou co se týká počtu homologů pro β -katenin. U *C. elegans* byly identifikovány hned čtyři – BAR-1, HMP-2, SYS-1 a WRM-1. Navýšení homologů pro β -katenin u háďátka může vysvětlovat dvojí funkci β -kateninu v buňce, kterou si jednotlivé homology u háďátka rozdělily mezi sebe. HMP-2 vykazuje nejvyšší identitu s lidským β -kateninem (Jackson & Eisenmann, 2012), ale na rozdíl od ostatních homologů se neúčastní signalizace Wnt. Místo toho reguluje tvorbu buněčných spojů (Korswagen *et al.*, 2000).

Signální dráha proteinu Wnt využívající BAR-1 je nejvíce podobná té u vyšších organismů. BAR-1 obsahuje doménu vázající POP-1/TCF a na jeho N-koncové části byla identifikována konzervovaná fosforylační místa pro proteiny homologní ke GSK3 β a CK1 (Eisenmann *et al.*, 1998; Natarajan *et al.*, 2001). Také bylo popsáno, že stabilita BAR-1 je kontrolována destrukčním komplexem a ubikvitinací stejně jako u octomilky nebo savců (Korswagen *et al.*, 2002; Dreier *et al.*, 2005). Mezi popsané děje, které využívají signalizaci Wnt s BAR-1, patří například vývoj vulvy. V tomto ději se signalizace Wnt podílí na specifikaci osudu prekurzorových buněk vulvy. Hlavními regulujícími ligandy jsou CWN-1 a EGL-20, které spustí signální kaskádu, jež ústí v expresi HOX genu *lin-39* (Eisenmann *et al.*, 1998; Gleason *et al.*, 2006). Nejlépe prostudovaným dějem, který je často používán pro studium signální dráhy proteinu Wnt u *C. elegans*, je migrace potomků neuroblastů Q v antero-posteriorní ose těla. V této práci je analýza tohoto děje také využita, a proto je migrace neuroblastů Q podrobněji popsána v následující kapitole (viz 1.3.1.).

Avšak u *C. elegans* existuje ještě odlišná signální dráha Wnt, která využívá zbylé dva homology pro β -katenin – WRM-1 a SYS-1. Přestože tato dráha zahrnuje proteiny klasické kanonické dráhy, signalizace nereguluje stabilitu β -kateninu, místo toho kontroluje asymetrické dělení buňky prostřednictvím rozdílné distribuce proteinů účastnících se signalizace Wnt. U mateřské buňky jsou homology pro Fz a Dvl lokalizovány na posteriorní straně buňky, kde je přijímán signál Wnt, zatímco negativní regulátory, jako jsou homology pro Axin a APC, jsou lokalizované na opačné straně buňky. Rozdílná distribuce proteinů vede po rozdělení mateřské buňky k možné aktivaci signální dráhy proteinu Wnt pouze u jedné z dceřiných buněk, té která nezdělala negativní regulátory, zatímco v druhé buňce je transkripce cílových genů signalizace Wnt inhibována (shrnutí Lam & Phillips, 2017). Příkladem této dráhy je asymetrické dělení buňky T nacházející se v ocasní části *C. elegans*. Tato buňka reaguje na LIN-44, který je produkovaný sousedními buňkami hyp10/11 umístěnými posteriorně za buňkou T (Herman *et al.*, 1995). Asymetrickým dělením vzniknou dvě buňky jejichž osud je odlišný. Z dceřiných buněk

T.a se diferencují buňky hypodermis, zatímco buňka T.p generuje nervové buňky (shrnutí Inglis *et al.*, 2018).

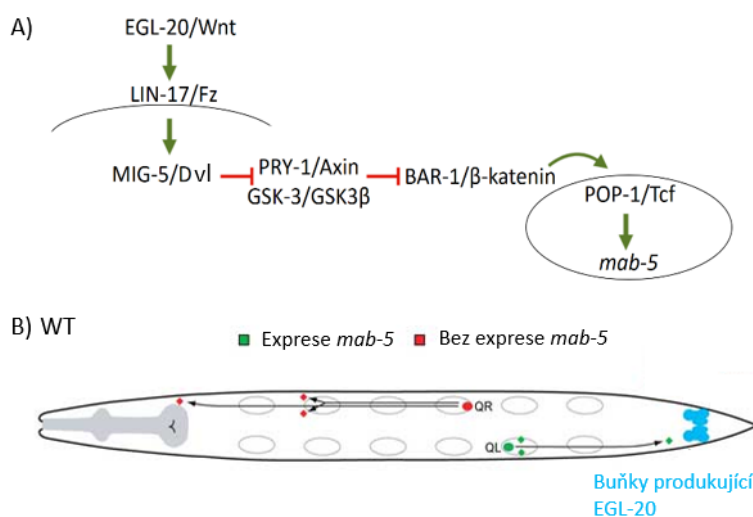
1.3.1. Migrace neuroblastů Q

Jak bylo zmíněno výše, jednou z možností, jak studovat signalizaci Wnt u *C. elegans*, je analýza fenotypu QL. V tomto případě signální dráha Wnt reguluje migraci specifické skupiny neuronů, jež se diferencují z neuroblastů Q. Tyto neuroblasty vznikají ve stejné pozici, QR na pravé a QL na levé straně, mezi hypodermálními buňkami V4 a V5, které se nacházejí v zadní části těla jedince. Oba neuroblasty generují stejnou sadu migrujících potomků, jejichž poloha se ustanovuje během časného larválního stádia háďátka (L1) v antero-posteriorní ose těla. Některé buňky projdou apoptózou, ale z ostatních vzniknou senzorické neurony AQR, PQR, mechano-senzorické neurony AVM, PVM a interneurony SDQR a SDQL (Sulston & Horvitz, 1977; Chalfie & Sulston, 1981). Je zajímavé, že i když QR a QL tvoří stejnou linii potomků, jejich dceřiné buňky migrují opačným směrem (Sulston & Horvitz, 1977).

Migraci neuroblastů Q lze rozdělit na dvě fáze, kdy každá je regulována jiným mechanismem. V iniciální fázi migrace se nejdříve ustanovuje pravo-levá asymetrie neuroblastů Q. Následuje migrace na krátkou vzdálenost, kdy QR polarizuje a migruje přes V4 směrem k přední části těla, a naopak QL polarizuje a migruje přes V5 směrem k zadní části. Mezi identifikované proteiny účastníci se iniciální fáze migrace patří transmembránové proteiny DPY-19, MIG-21 a dále protein UNC-40 podílející se na navádění axonů a buněk v dorzo-ventrální ose (Honigberg & Kenyon, 2000; Middelkoop *et al.*, 2012; Sundararajan & Lundquist, 2012). Mutace v genech pro tyto proteiny způsobují nekontrolovatelné formování membránových výběžků více směry, což narušuje jejich schopnost správné polarizace jedním směrem a vede tak k chybné počáteční migraci (Honigberg & Kenyon, 2000; Middelkoop *et al.*, 2012). Přestože některé regulující proteiny jsou známy, mechanismus časné polarizace a migrace zůstává stále nejasný.

Další fáze migrace je již kontrolována signalizací Wnt řízenou ligandem EGL-20/Wnt, která ústí v expresi HOX genu *mab-5* u QL dceřiných buněk a udržení migračního vzoru v antero-posteriorní ose (Obr. 3). Přejícným dějem mezi iniciální fází a migrací řízenou signalizací Wnt, je první dělení neuroblastů Q (shrnutí Rella *et al.*, 2016). Důvodem rozdílné migrace dceřiných buněk u QR a QL je odlišná odpověď neuroblastů na signalizaci Wnt řízenou EGL-20 (Harris *et al.*, 1996; Maloof *et al.*, 1999). Oba neuroblasty jsou vystaveny stejným hladinám EGL-20, ale pouze QL je senzitivní na EGL-20, což zahájí transdukci signálu (Whangbo & Kenyon, 1999). Naopak QR není senzitivní na EGL-20, nezahájí se exprese

mab-5, a proto potomci tohoto neuroblastu migrují směrem k anterioru (Salser & Kenyon, 1992; Harris *et al.*, 1996; Maloof *et al.*, 1999).



Obrázek 3. Kanonická signální dráha Wnt u neuroblastů Q.

A) Schématické znázornění transdukce signálu v buňce přijímající signál Wnt. Názvy členů této dráhy jsou uvedené v pořadí protein *C. elegans*/savčí homolog.

B) Schématické znázornění výsledné lokalizace neuroblastů Q i jejich dceřiných buněk. QL reaguje na gradient EGL-20/Wnt zahájením kanonické signální dráhy Wnt, jejímž

výsledkem je exprese *mab-5* a pohyb potomků směrem k posterioru. Naopak neuroblast QR není senzitivní k EGL-20 a jeho dceřiné buňky migrují směrem k anterioru. Upraveno podle (Sawa & Korswagen, 2013).

Pokud je některá z komponent signální dráhy Wnt narušená, dojde k defektní migraci, kdy jeden z potomků QL (PVM) migruje směrem k anterioru, což se označuje jako fenotyp QL. Kvantifikace migrace PVM je skvělým nástrojem pro studium nových potenciálních regulátorů kanonické signalizace Wnt, jelikož jsou do tohoto děje zapojeny všechny komponenty dráhy Wnt. Fenotyp QL byl pozorován u mutací, jež vedou ke ztrátě funkce *mig-14/Wls*, *egl-20/Wnt*, *lin-17/Fz*, *mig-1/Fz*, *mig-5/Dvl*, *bar-1/β-katenin*, *pop-1/Tcf*, *mab-5/Hox* a komponent retromerového komplexu *snx-3*, *vps-26*, *vps-29*, *vps-35* (Salser & Kenyon, 1992; Harris *et al.*, 1996; Maloof *et al.*, 1999; Bänziger *et al.*, 2006; Coudreuse *et al.*, 2006; Walston *et al.*, 2006; Harterink *et al.*, 2011). U všech těchto mutantů byla pozorována obrácená migrace PVM, značící narušenou aktivitu signalizace Wnt. Kromě toho mutace v *pry-1/Axin* a *axl-1/Axin* vedou k defektní migraci QR dceřiné buňky, zatímco nadměrná exprese těchto homologů pro Axin způsobuje fenotyp QL, což potvrzuje jejich negativní vliv na signalizaci Wnt i u *C. elegans* (Korswagen *et al.*, 2002; Oosterveen *et al.*, 2007).

1.4. Fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináza

Fosfoinositidy jsou nezbytnou součástí regulace mnoha buněčných procesů. Jak bylo zmíněno výše, podílí se na vezikulárním transportu, přestavbě cytoskeletu nebo právě na signální transdukci, kdy rekrutují signální komplexy do místa působení. Vzhledem k důležité

signální funkci fosfoinositidů v buňce musí být jejich hladiny přísně regulovány v časoprostorovém měřítku. Za jejich syntézu jsou zodpovědné specifické kinázy, zatímco degradaci jednotlivých fosfoinositidů regulují fosfatázy. Byla identifikována řada těchto enzymů a jak kinázy, tak fosfatázy můžeme rozdělit do tří hlavních skupin podle toho, kterou OH skupinu na inositolovém kruhu regulují (shrnutí Sasaki *et al.*, 2009).

PI kinázy jsou velmi konzervované napříč Eukaryoty, což jen podtrhuje význam těchto enzymů a jejich produktů ve fyziologii eukaryotických buněk (Sasaki *et al.*, 2009). V této práci jsme se zaměřili na potenciální vliv kinázy z rodiny fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináz (PIP5K) na regulaci signální dráhy Wnt. Tato rodina fosforyluje inositolový kruh PI(4)P na 5-OH pozici za vzniku PI(4,5)P₂ (Rameh *et al.*, 1997). Třebaže rodina PI4K (fosfatidylinositol 4-kináz) je také schopna tvorby PI(4,5)P₂, tak PIP5K je považována za majoritní rodinu produkující PI(4,5)P₂ na plazmatické membráně (Stephens *et al.*, 1991; Whiteford *et al.*, 1997).

Savci kódují tři izoformy PIP5K – PIP5K α , PIP5K β a PIP5K γ (názvosloví PIP5K α a PIP5K β je u myšího modelu obrácené) (Ishihara *et al.*, 1996; Loijens & Anderson, 1996; Ishihara *et al.*, 1998). PIP5K α a PIP5K β jsou exprimovány v mnoha tkáních (srdce, kosterní svalstvo, ledviny, plíce, slinivka) (Loijens & Anderson, 1996), zatímco PIP5K γ má velkou převahu v nervové soustavě, především v mozku (Ishihara *et al.*, 1998; Wenk *et al.*, 2001). Všechny izoformy PIP5K sdílejí stejnou centrální doménu, která je z 80 % identická mezi těmito proteiny (Ishihara *et al.*, 1998). Důležitou strukturní oblastí je C-koncová část této centrální domény, kde se nachází aktivační smyčka (Rao *et al.*, 1998), jež je nezbytná pro substrátovou specifitu jednotlivých PIP5K (Kunz *et al.*, 2000, 2002).

Produkt této rodiny – PI(4,5)P₂ – je díky svému umístění na plazmatické membráně prostředníkem pro transdukcii extracelulárních signálů směrem do buňky. Může sloužit jako substrát pro fosfolipázu C, která je schopna hydrolyzovat PI(4,5)P₂, čímž vznikají rozpustné formy inositolfosfátu. Mezi něž patří produkty IP₃ a 1,2-diacylglycerol, které mohou sloužit jako druzí poslové, jež následně regulují hladiny vápenatých iontů či aktivitu proteinkinázy C (shrnutí Katan & Cockcroft, 2020). Nicméně fosfoinositid PI(4,5)P₂ je schopen i přímé interakce s intracelulárními proteiny. Bylo identifikováno mnoho vazebných domén – PH, FERM, ANTH, ENTH a další, které tento bisfosfát rozpoznávají (shrnutí Lemmon, 2003), což tomuto fosfoinositidu umožňuje regulovat umístění a aktivitu nepřeberného množství proteinů a tím se podílet na mnoha buněčných dějích.

Důležitou roli má v přenosu signálu z plazmatické membrány k aktinovému cytoskeletu. Příkladem je interakce PI(4,5)P₂ s talinem, což je protein fokálních adhezí, které zajišťují signalizaci mezi aktinovým cytoskeletem buňky a extracelulární matrix prostřednictvím

integrinů. PI(4,5)P2 se váže přes doménu FERM na talin, čímž ho stabilizuje v aktivní konformaci a zvyšuje tak jeho afinitu k integrinům. Dokonce samotná PIP5K se váže na talin, čímž reguluje množství PI(4,5)P2 v této aktivní oblasti (Di Paolo *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2002; Barsukov *et al.*, 2003). PIP5K je ale také důležitá pro signalizaci mezi dvěma buňkami. PIP5K se totiž váže jak na E-kadherin, tak na klatrinový adaptorový protein (AP), který zprostředkovává bazolaterální transport v epiteliálních buňkách. PIP5K tak slouží jako spojovací článek mezi E-kadherinem a AP a pravděpodobně díky lokalizované produkci PI(4,5)P2 se podílí na regulaci transportu E-kadherinu (Ling *et al.*, 2007).

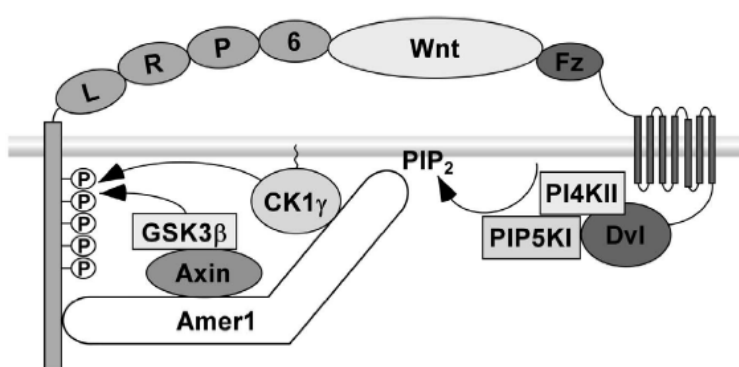
PI(4,5)P2 je dále důležitý pro polymerizaci aktinu, kterou je schopen kontrolovat na mnoha úrovních. Na tento bisfosfát se totiž váže jak pozitivní regulátor polymerace aktinových mikrofilament - profilin, tak gelsolin, který naopak depolymeruje F-aktin (shrnutí Niggli, 2005). Vazba gelsolinu na PI(4,5)P2 brání jeho asociaci s F-aktinem, zatímco vazba profilinu na PI(4,5)P2 napomáhá k uvolnění aktinového monomeru, který se může začlenit do rostoucího filamenta, a usnadňuje tak polymerizaci aktinu (Lambrechts *et al.*, 2002; Skare & Karlsson, 2002). Kromě této funkce PI(4,5)P2 reguluje další důležitý proces v přestavbě aktinového cytoskeletu, a to větvení aktinových mikrofilament. Dobře popsáným mechanismem je spolupráce PI(4,5)P2 s Cdc42, jenž patří do skupiny malých GTPáz. Samostatně jsou Cdc42 i PI(4,5)P2 slabými aktivátory N-WASP. Avšak jejich společná vazba na protein N-WASP způsobí silnou aktivaci díky konformační změně, čímž se umožní vazba komplexu ARP2/3, jenž zprostředkuje větvení F-aktinu (Rohatgi *et al.*, 2000).

S přestavbou aktinového cytoskeletu souvisí další buněčný děj, a to migrace. Protahující se část buňky je obohacena proteiny, které regulují aktinový cytoskelet. PIP5K byla pozorována v mnoha membránových výbězcích a některé práce naznačují, že různé stimuly mohou aktivovat různé izoformy PIP5K, což vede k řízené migraci buněk. Například PIP5K γ je rekrutována do membránových zvlnění v reakci na EGF (Sun *et al.*, 2008). Podobně tak odpovídá i PIP5K α , která navíc reaguje i na stimulaci PDGF (Doughman *et al.*, 2003).

Další důležitou funkci má PIP5K ve vezikulárním transportu. Tento děj je spjatý s endocytózou zprostředkovanou klatrinem a bylo ukázáno, že ztráta funkce PIP5K γ způsobila narušení vezikulárního transportu v nervových buňkách, jak na membráně, tak v endozómech (Wenk *et al.*, 2001; Paolo *et al.*, 2004). Už dlouho je známo, že PI(4,5)P2 na plazmatické membráně slouží k vazbě potřebných endocytických proteinů (Jost *et al.*, 1998). Nejznámější úlohou tohoto fosfoinositidu je vazba AP-2 do jeho místa působení, čímž dojde ke konformační změně AP-2. Aktivní konformace tohoto proteinu následně rekrutuje klatrin potřebný pro vytvoření endocytických váčků. Nicméně je vytvořena i pozitivní zpětná vazba, kdy AP-2

aktivuje PIP5K, čímž se zvedne produkce PI(4,5)P₂. Vyšší hladiny bisfosfátu podporují další rekrutování klatrinu a tvorbu klatrinového váčku (Krauss *et al.*, 2006). Avšak úloha PI(4,5)P₂ v endocytóze tímto nekončí. Do místa vzniku váčku je prostřednictvím PH domény vázající se na PI(4,5)P₂ rekrutován dynamin, který je zodpovědný za odštěpení váčku (Achiriloaie *et al.*, 1999). Po odštěpení vznikajícího váčku z membrány je PIP(4,5)P₂ defosforylován fosfatázou synaptojanin za vzniku PI(4)P, čímž dojde k uvolnění klatrinu z váčku, který následně může putovat z plazmatické membrány do místa určení (Cremona *et al.*, 1999; Wenk *et al.*, 2001).

V posledních letech se objevují důkazy o zapojení PIP5K do regulace signální dráhy proteinu Wnt. U drápatky a u myši byly popsány modely, kde aktivovaný protein Dvl váže PIP5K, což má za následek produkci PI(4,5)P₂. Také bylo pozorováno, že zvýšené hladiny tohoto fosfoinositidu na vnitřní straně plazmatické membrány v místě vazby Wnt na receptory ovlivňují fosforylaci LRP5/6 (Pan *et al.*, 2008b; Lee *et al.*, 2015). Mechanismus této regulace byl upřesněn u savčích buněk (Obr. 4) (Tanneberger *et al.*, 2011). Jak bylo popsáno výše, signalizace je aktivována vazbou ligandu Wnt na receptor Fz, což vede k aktivaci Dvl (viz 1.2.3.). Dvl následně váže a aktivuje PIP5K a PI4K, čímž dojde ke tvorbě PI(4,5)P₂, jehož zvýšená hladina zahájí hromadění proteinu Amer1. Tento protein je zodpovědný za rekrutování Axinu z destrukčního komplexu k membráně. V důsledku toho se do blízkosti LRP5/6 dostane GSK3β, která ve spolupráci s membránovou CK1γ fosforyluje tento koreceptor (Tanneberger *et al.*, 2011).



Obrázek 4. Schéma zapojení PIP5K do regulace signální dráhy Wnt.

Aktivní kaskáda v buňce přijímající signál Wnt aktivuje Dvl, jenž váže a aktivuje kinázy PIP4 a PIP5. Tím dojde k vyšší produkci PI(4,5)P₂, což způsobí přesun Amer1 k membráně. Amer1 je schopen vázat Axin. Výsledkem je přesun destrukčního

komplexu k plazmatické membráně, čímž je umožněna fosforylace LRP5/6 a propagace signálu. Převzato z (Tanneberger *et al.*, 2011).

1.5. PPK-1

Rodina PIP5K je u *C. elegans* zastoupena kinázou nazvanou PPK-1 (Weinkove *et al.*, 2008). Přestože savci mají tři izoformy pro tuto kinázu (α , β , γ), bylo popsáno, že otevřený čtecí rámec F55A12.3, jenž kóduje PPK-1, je podobný všem třem savčím izoformám. Dále bylo

ukázáno, že PPK-1 obsahuje 16 z 22 amino kyselin z konzervované části všech lidských PIPK, která vytváří aktivační smyčku a je zodpovědná za specifitu k substrátu (Weinkove *et al.*, 2008).

Gen *ppk-1* se u *C. elegans* exprimuje především v buňkách nervové soustavy, kde se stejně jako u savců lokalizuje na plazmatickou membránu (Weinkove *et al.*, 2008). Ve velké míře se také exprimuje u jedinců v embryonálním stádiu a u dospělců v menší míře v buňkách spermatéky, distální části gonád, hypodermálních buňkách V1-V6, ve střevě a svalových buňkách obklopujících tělo hád'átka (Xu *et al.*, 2007; Weinkove *et al.*, 2008). Funkce PPK-1 je málo prozkoumaná, nicméně recentní studie poukazují na některé možné vlivy této kinázy.

I přes svou dominanci v nervové tkáni je PPK-1 důležitým regulátorem reprodukce *C. elegans*. Bylo ukázáno, že ztráta exprese *ppk-1* způsobuje vadný průběh ovulace, kdy mutantní jedinci vykazují sníženou kontraktilitu gonád a narušenou organizaci cytoskeletu vedoucí až ke sterilitě. Nicméně navýšením aktivity signalizace IP3 dokázalo zvrátit sterilitu způsobenou snížením exprese *ppk-1*. Z toho autoři usuzují, že by PPK-1 mohla interagovat s IP3, jenž by následně mohl mít vliv na přestavbu cytoskeletu v gonádách (Xu *et al.*, 2007). Kromě toho má PPK-1 vliv i na zárodečné buňky *C. elegans*. U nich reguluje meiotické dělení, především profázi I. RNA interference *ppk-1* způsobuje změny ve struktuře chromozomů, které se odráží ve zvýšené transkripční aktivitě během profáze I. Jedinci také vykazují vady v embryonálním vývoji – sníženou velikost plodu, aneuploidie v potomstvu a defekty v synapsích (Ulicna *et al.*, 2018).

Další popsanou funkcí této kinázy je vliv PPK-1 na asymetrické dělení buňky. Bylo pozorováno, že snížená exprese *ppk-1* vede ke ztrátě polarity během tohoto buněčného děje. Autoři studie zjistili, že kináza PPK-1 je nabohacena na posteriorní straně jednobuněčného embrya. Pravděpodobně díky navýšeným hladinám PI(4,5)P2 na této straně embrya dojde k přesunu cytotozolických regulačních proteinů, které jsou zapotřebí pro asymetrické umístění dělicího vřeténka a jeho nerovnoměrné rozložení tažných sil (Panbianco *et al.*, 2008).

Oproti dosud popsaným studiím, jež se zabývaly ztrátou funkce *ppk-1*, se nadměrnou produkcí PPK-1 u *C. elegans* do této doby zabývala pouze jedna práce. V té nadprodukce PPK-1 měla za následek defektní růst nervových zakončení u vyvíjejících se neuronů a u dospělého jedince nadměrná produkce PPK-1 vedla k neurodegeneraci (Weinkove *et al.*, 2008).

2. Cíle

Signální dráha proteinu Wnt je důležitá diferenciační a homeostatická dráha, která je velmi konzervovaná napříč živočichy. Jedná se zároveň o velmi komplexní proces ovlivněný mnoha regulačními proteiny. Jedním z nich by mohla být kináza PPK-1, jež je zásadní pro produkci PI(4,5)P₂ v buňkách *Caenorhabditis elegans*. U savčích buněk byl už popsán mechanismus zapojení homologní kinázy do regulace signální dráhy proteinu Wnt, který by mohl fungovat i u *C. elegans* v přijímajících buňkách. U háďátka ale chybí některé důležité komponenty ze zmíněného savčího modelu. Alternativně by mohla PPK-1 ovlivňovat endocytózu MIG-14/Wls v buňkách produkujících Wnt, nebo se podílet na formování gradientu ovlivněním endocytózy samotného proteinu Wnt. Hlavním cílem práce bylo ověření možného zapojení PPK-1 do regulace signální dráhy Wnt u *C. elegans*.

Naše práce byla rozdělena na 4 hlavní cíle:

1. Ověřit, s kterými členy kanonické dráhy závislé na EGL-20/Wnt *ppk-1* geneticky interaguje.
2. Ověřit, v kterých buňkách je funkce PPK-1 nezbytná pro správnou migraci neuroblastů Q pomocí tkáňově specifické nadprodukce a degradace PPK-1.
3. Prozkoumat zapojení PPK-1 v časně polarizaci a migraci neuroblastu QL.
4. Otestovat vliv PPK-1 na signalizaci prostřednictvím dalších homologů ligandu Wnt.

3. Materiály a metody

3.1. Kmeny

3.1.1. Bakteriální kmeny

OP50	uracilový auxotrof <i>E. coli</i> používaný pro standardní kultivaci <i>C. elegans</i>
DH5 α	kompetentní buňky <i>E. coli</i> používané pro klonování DNA v plazmidu
DB3.1	kompetentní buňky Survival TM -2 používané pro klonování plazmidů nesoucích gen <i>ccdB</i>
HT115	kmen <i>E.coli</i> obsahující polymerázu T7 indukovatelnou IPTG, používaný pro experimenty s RNAi

3.1.2. Kmeny a transgeny *C. elegans*

N2 Bristol	laboratorní kmen používaný jako divoký typ <i>C. elegans</i>
------------	--

mutantní alely

LGII: <i>mig-5</i>	(<i>cp385[mNG-GLO^{AID}::mig-5]</i>) (Heppert <i>et al.</i> , 2018)
<i>mig-14</i>	(<i>mu71</i>)
<i>rrf-3</i>	(<i>pk1426</i>)
LGIII: <i>mtm-6</i>	(<i>ok330</i>)
<i>vps-29</i>	(<i>tm1320</i>)
<i>sel-5</i>	(<i>ok363</i>)
LGV: <i>mtm-9</i>	(<i>ar479</i>)

Kmeny pocházejí z Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota).

transgeny

LGII:	<i>mul32 [mec-7p::GFP; lin-15(+)]</i> (Ch'ng <i>et al.</i> , 2003)
LGV:	<i>mul35 [mec-7p::GFP; lin-15(+)]</i> (Ch'ng <i>et al.</i> , 2003)
	<i>heIs63 [wrt-2p::GFP::PH+wrt-2p::GFP::H2B+lin-48p::mCherry]</i> (Wildwater <i>et al.</i> , 2011)
Extrachromozomální:	<i>mamEx12 [egl-20p::ppk-1::gfp; myo-2p::tdTomato]</i>
	<i>mamEx31 [wrt-2p::ppk-1::gfp; myo-2p::tdTomato]</i>
	<i>mamEx32 [myo-3p::ppk-1::gfp; myo-2p::tdTomato]</i>
	<i>mamEx33 [dpy-7p::ppk-1::gfp; myo-2p::tdTomato]</i>
	<i>mamEx34 [egl-20p::TIR1::mRuby; myo-2p::tdTomato]</i>
	<i>mamEx35 [wrt-2p::TIR1::mRuby; myo-2p::tdTomato]</i>

3.2. Kultivace *C. elegans*

3.2.1. Kultivační média

Růstové bakteriální médium

Na přípravu 1 litru média Luria-Bertani (LB) byly smíchány následující přísady:

trypton.....10 g
NaCl.....10 g
kvasinkový extrakt.....5 g

Doplněno vodou do 1 litru a sterilizováno v autoklávu. Pro přípravu agarových misek s LB se přidalo 15 g agaru. Pro selekční LB byla přidána příslušná antibiotika.

Pufr M9

Pufr M9 se používá pro oplach hád'átek z misek s růstovým médiem pro kultivaci *C. elegans* (NGM). Na přípravu 1 litru pufru M9 byly smíchány následující přísady:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$7,16 g
 KH_2PO_43 g
NaCl.....5 g
1M MgSO_41 ml

Doplněno vodou do 1 litru a sterilizováno v autoklávu.

3.2.2. Příprava agarových misek s NGM

Na přípravu 1 litru agarových misek s NGM byly smíchány následující přísady:

NaCl.....3 g
trypton.....2,5 g
agar.....17 g
 H_2O972 ml

Sterilizováno v autoklávu při 120 °C. Po vychladnutí agaru na teplotu 55 °C, byly přidány následující přísady:

1M CaCl.....1 ml
cholesterol v EtOH (5mg/ml).....1 ml
1M MgSO_41 ml
pufr KPO_425 ml

Do misek (o průměru 60 mm) se nalilo 10 ml NGM a nechaly se ztuhnout přes noc při pokojové teplotě. Současně se přes noc dal kultivovat bakteriální kmen OP50 ve 37 °C v LB. Další den se na každou misku s NGM napipetovalo 35 µl kultury OP50, bakterie se rozetřely a nechaly růst přes noc při pokojové teplotě. Následující den byly misky připraveny pro kultivaci *C. elegans* nebo se skladovaly pro pozdější použití ve 4 °C.

Misky s NGM a háďátky se kultivovaly ve 20 °C. Pokud bylo zapotřebí pomalejšího růstového a životního cyklu háďátek, tak se kultivovaly v 15 °C.

Na přípravu 500 ml pufru KPO₄ byly smíchány následující přísady:

KH₂PO₄.....54,2 g

K₂HPO₄.....17,8 g

Doplněno vodou do 500 ml a upraveno pH na 6,0, následně byl pufr sterilizován v autoklávu.

3.2.3. Purifikace znečištěných misek s *C. elegans*

Tato metoda využívá vysoké odolnosti embryí vůči agresivním chemikáliím a používá se pro odstranění nežádoucích bakteriálních kontaminací na kultivačních miskách. Gravidní háďátka ze znečištěných misek byla opláchnuta pufrem M9 a přenesena do zkumavky (1,5 ml). Zkumavka se centrifugovala 30 sekund při nízké rychlosti (500 x g). Odsál se supernatant, peleta s háďátkami byla resuspendována ve 350 µl pufru M9 a přenesena do čisté zkumavky. Pro purifikaci se přidalo 150 µl směsi 5M KOH a roztoku bělidla (Savo) v poměru 1:2. Obsah zkumavky se důrazně promíchal a byl neustále kontrolován pod binolupou. Když došlo k lyzi většiny háďátek, tak byla zkumavka centrifugována (4000 x g, 30 sekund) a supernatant se odstranil. Peleta se třikrát opláchla pufrem M9. Nakonec se peleta s embryi ponechala v přibližně 50 µl pufru M9 a přenesla na čistou misku s NGM. Alternativně se tato metoda dá použít pro synchronizaci vývoje háďátek.

3.3. Experimenty s RNAi

Agarové misky pro experimenty s RNAi byly připraveny stejným způsobem jako pro běžnou kultivaci *C. elegans* (viz 3.2.2.). Nicméně po sterilizaci v autoklávu se přidaly následující přísady:

Ampicilin.....finální koncentrace 50 µg/ml

Tetracyklin.....finální koncentrace 12,5 µg/ml

IPTG.....finální koncentrace 1mM.

Dále byly použity klony bakteriálního kmene HT115 z knihovny RNAi z laboratoře dr. Julie Ahringer (Kamath *et al.*, 2001) místo kmene OP50 pro běžnou kultivaci. Každý klon HT115 obsahuje plazmid L4440, do kterého byl vložen fragment kódující oblasti DNA cílového genu. Tento fragment je ohraničen promotory pro RNA polymerázu T7, jejíž exprese je indukována IPTG. Bakteriální klony pro RNAi byly vysety na připravené misky pro RNAi, kde došlo k indukci exprese polymerázy T7 a k syntéze dvouvláknové RNA (dsRNA). 5-10 hád'átek ve stádiu L4 bylo následně přendáno na tyto misky pro RNAi, kde se krmila produkovanou dsRNA. Účinek RNAi se sledoval u generace F1 (viz 3.8.), inkubované ve 20 °C, obvykle po 4 dnech inkubace.

3.4. Příprava linií pomocí mikroinjekce

Za účelem studia tkáňově specifické funkce genu *ppk-1* v signální dráze Wnt u *C. elegans* byly připraveny linie mikroinjekcí příslušného konstruktů. Pro přípravu stabilní linie transgenních zvířat bylo zapotřebí připravit směs plazmidů. Tato směs byla následně injikována do distální gonády jedince *C. elegans*. Plazmidy se rekombinují a vytvoří extrachromozomální strukturu, která se může začlenit do jádra některého z budoucích oocytů (Mello *et al.*, 1991).

Použitá směs pro mikroinjekci obsahovala tři plazmidy. První použitý plazmid obsahoval fluorescenční protein tdTomato exprimovaný pod kontrolou promotoru *myo-2*, jenž se exprimuje především v hltanu *C. elegans*. Exprese tdTomato v hltanu sloužila jako znak pro pozitivní selekci transgenních hád'átek. Další plazmid byl pBluescript, který je zapotřebí k optimalizaci celkového množství DNA pro tvorbu extrachromozomální struktury. Třetí plazmid nesl gen, který jsme chtěli exprimovat pod tkáňově specifickým promotorem (viz 3.6.).

Plazmidy ve směsi dosahovaly následujících finálních koncentrací:

pBluescript.....185 ng/μl

myo-2p::tdTomato.....5 ng/μl

připravený vektor.....5 ng/μl.

Směs plazmidů byla injikována do kmene *vps-29;muIs32*. Pro mikroinjekce byl využit invertovaný mikroskop s DIC (IX70, Olympus) a mikromanipulátor s mikroinjektorem (Transjector 5246 a FemtoJet 4i, Eppendorf). Hád'átka bylo zapotřebí před samotnou mikroinjekcí znehybnit, k čemuž sloužila vyschlá vrstva agarózy umístěná na podložním sklíčku. Na tuto vrstvu se kápl mikroinjekční olej (M8410, Sigma Aldrich), do něhož se přeneslo hád'átka. Směs byla injikována do distální gonády mladého dospělého hermafroditního zvířete. Po mikroinjekci byl přidán do kapky ke zvířeti pufr M9, aby se zvíře odlepilo a zbavilo

oleje. Poté bylo přendáno na novou misku s NGM a kultivováno ve 20 °C. Po naklazení embryí se zkontrolovala generace F1 pod fluorescenčním mikroskopem na přítomnost zvířat, jejichž hltan svítil červeně. Pro kontrolu, jestli se transgen dědí, se pozitivně selektovaní jedinci přenesli po jednom na nové misky s NGM a zkontrolovala se generace F2 na přítomnost selekčního fluorescenčního znaku. Následně byla zvířata zkontrolována pod fluorescenčním mikroskopem, jestli se exprimuje cílový gen v daných buňkách. Pro další kultivaci byli vybíráni pouze jedinci exprimující tdTomato v hltanu, aby se zajistila stabilní dědičnost extrachromozomální struktury.

3.5. Příprava plazmidů pro mikroinjekce

3.5.1. Použité vektory a primery

Vektory

Plazmid	Využití	Zdroj
pJET1.2	klonovací vektor ze systému cloneJET PCR	ThermoFisher
pPD95.81	použitý pro expresi PPK-1 značeného GFP pod tkáňově specifickými promotory	Addgene plasmid 1497 (Fire <i>et al.</i> , nepublikováno)
pJW1583	použitý pro konstrukci opravného templátu <i>ppk-1-AID</i> , nese selekční kazetu	Addgene plasmid 121054 (Ashley <i>et al.</i> , 2021)
pDD162	použitý jako vektor pro vnesení <i>ppk-1</i> sgRNA a Cas9 u AID systému	Addgene plasmid 47549 (Dickinson <i>et al.</i> , 2013)
pLZ31	použitý pro konstrukci vektoru <i>wrt-2p::TIR1</i> , templát pro TIR1	Addgene plasmid 71720 (Zhang <i>et al.</i> , 2015)

Primery

dpy7p-pPD-F	TGGATACGCTAACAACCTTGGAAATGAAATAAGCTTATCTCATTCCACGATTTCTCG
myo3p-pPD-F	TGGATACGCTAACAACCTTGGAAATGAAATAAGCTTAGTGATTATAGTCTCTGTTTTCTG
pJet1.2fw-new	CTGCTTTAACAACCTTGTGCCTG
pJet1.2rev-new	CTACAACGGTTCCTGATGAGG
pDD162sgins-uni-R	CAAGACATCTCGCAATAGG
pPD95-R	AAGCTTATTTTCATTTCCAAGTTGTT
ppk1-3arm-Flong	ACAAGCGTGATTACAAGGATGACGATGACAAGAGAAGAAAGATGCTTCTTCTTCATCTTC
ppk1-3arm-R2long	CACACAGGAAACAGCTATGACCATTTATCGATTTCTGAAACTGAAGACTATGTCCGG
ppk1-5arm-Flong	TCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCGCCGGCACAGGAATCAATGAGGATCGG
ppk1-5arm-Rlong	TTACTCATCGATGCTCCTGAGGCTCCCGATGCTCCAGCGACAGGTGTGTCACCAC
ppk1-3UTR-R2	CCGATTAGTATCCACCCGCA
ppk1ex10-F	TGGATCTCAAACAGCACGAG
ppk1ex1-F2	ATGGCTTCTCGGTCCACAAC
ppk1-dpy7p-R	CGTTTGAAGGCGATTGTTGTGGACCGAGAAGCCATTTATCTGGAACAAAATGTAAGAATA
ppk1-myo3p-R	CGTTGAAGGCGATTGTTGTGGACCGAGAAGCCATTTCTAGATGGATCTAGTGGTCG
ppk1_pDD162_sgRNA	CGAAAAAGTGCCCGAAGAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
ppk1_pJW1583_PAMmut-F	AGTGCCCGAAGAACAAGAAGAAGCAGAGGAAATTGTG
ppk1_pJW1583_PAMmut-R	CACAATTTCTCTGCTTCTTCTTGTTCTTCGGGCACT
ppk1-sglCtag-T7	GTAATACGACTCACTATAGGAGCATCTTTCTTCAAGCGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
ppk1-wrt2p-R	CGTTTGAAGGCGATTGTTGTGGACCGAGAAGCCATCCGAGAAACAATTGGCAGGTTG
sgRNAuni-R	AAAAGCACCGACTCGGTGC
TIR1cel-F	ATGCAAAAGAGAATCGCCTTG
TIR1wrt2p-R	TCTTCTGGAAACGACAAGGCGATTCTCTTTTGCATCCGAGAAACAATTGGCAGGT
wrt2p-pPD-F	TGGATACGCTAACAACCTTGGAAATGAAATAAGCTTCAGGTAATTTTACAACATCCG

3.5.2. Klonování – obecný postup

3.5.2.1. Amplifikace fragmentů DNA pro klonování

Nejdříve bylo zapotřebí amplifikovat fragmenty cílové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Na přípravu 1 PCR byly smíchány následující komponenty:

5x pufr HF.....	10 µl
„forward“ primer (10µM).....	2,5 µl
„reverse“ primer (10µM).....	2,5 µl
dNTPs (10mM).....	1 µl
templát.....	50 ng/µl
DNA polymeráza Phusion.....	0,5 µl
ddH ₂ O.....	doplněno do 50 µl

Nastavení cycleru pro PCR:

98 °C.....2 min.....	iniciální denaturace
98 °C.....30 s.....	denaturace
60 °C.....30 s.....	nasedání primerů
72 °C.....1 min/kb.....	elongace
72 °C.....5 min.....	finální elongace

Krok 2-4 se opakoval 35x.

Produkty PCR byly zkontrolovány elektroforetickou separací fragmentů DNA (viz 3.9.1.). Po kontrole bylo provedeno štěpení enzymem DpnI při 37 °C po dobu 2 hod, tím byla odstraněna templátová DNA. Následně byly vzorky s fragmenty DNA přečištěny komerčním kitem DNA Clean and Concentrator TM-5 (Zymo Research). Pro účely Gibsonovy ligace byl pomocí PCR amplifikován jak vektor, tak i vkládaná sekvence.

3.5.2.2. Gibsonova ligace

Přečištěné fragmenty DNA se následně ligovaly do jednoho plazmidu. Pro tento účel byla využita Gibsonova metoda, která je založena na specifickém navržení primerů, které mají přesahující konce s následujícím fragmentem (Gibson *et al.*, 2009). K 15 µl Gibsonovy směsi bylo přidáno 5 µl fragmentů, většinou v poměru 1:1 nebo v nadbytku jednoho fragmentu (3:2). Ligace proběhla v 50 °C 1 hod.

Gibsonova směs

5x pufr ISO.....320 µl

10 U/µl exonukleáza T5.....0,64 µl

2 U/µl polymeráza Phusion.....20 µl

40 U/µl ligáza Taq.....160 µl

Doplněno ddH₂O do 1,2 ml a rozděleno do alikvótů (po 15 µl) a skladováno v -20 °C.

3.5.2.3. Bakteriální transformace

Ligovaný plazmid byl transformován do kompetentních buněk DH5α bakteriálního kmene *E. coli*, které byly skladovány v -80 °C. Tyto buňky se nejdříve nechaly postupně rozmrazit na ledu. Poté se přidalo ke 100 µl kompetentních buněk DH5α 2,5 µl ligační směsi a opatrně se obsah promíchal. Směs se ponechala 30 min na ledu a následně se provedl teplotní šok na 70 s ve 42 °C. Po teplotním šoku se směs dala opět na led na dobu 5 min. Poté se přidalo 750 µl média LB a takto připravená směs se inkubovala 1 hod ve 37 °C. Nakonec se směs vysela na agarovou misku s LB a se selekčním antibiotikem (ampicilinem) a kultivovala do druhého dne v termostatu ve 37 °C. Pro následnou analýzu bylo vybráno 2-10 kolonií, u kterých byla provedena izolace plazmidové DNA (viz 3.5.2.4.).

3.5.2.4. Izolace plazmidů a jejich precipitace

Bakterie nesoucí žádaný plazmid se nechaly růst přes noc v tekutém LB ve 37 °C. Izolace plazmidů byla prováděna pomocí komerčního kitu High Speed Plasmid Mini-Kit (Geneaid) nebo GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) podle protokolu od výrobce. Úspěšnost sestavení plazmidu byla otestována pomocí restrikčního štěpení příslušnými enzymy v 37 °C 1 hod. Všechna štěpení byla provedena restrikčními enzymy od firmy ThermoFisher. Alternativní způsob otestování byl metodou PCR (viz. 3.5.2.1.). Správně sestavené plazmidy se nakonec ověřily sekvenováním DNA.

Vektor pBluescript a plazmid nesoucí *myo-2p::tdTomato* byly izolovány komerčním kitem Plasmid Midi Kit (QIAGEN). Když došlo v naší laboratoři ke snížení účinnosti mikroinjekcí, tak byly tyto vektory precipitovány metodou využívající octan sodný v kombinaci s etanolem (EtOH). K 50 µl vzorku se přidalo 5 µl octanu sodného (3 M), následně 110 µl 100% EtOH a směs se nechala inkubovat hodinu v -20 °C. Poté se vzorek centrifugoval při 4 °C (13 000 rpm) po dobu 20 min. Dále se odstranil supernatant a přidal se stejný objem 70% EtOH a opět

centrifugovalo při 4 °C (13 000 rpm) 2 min. Následně se odstranil supernatant a zbytky EtOH se nechaly odpařit. Nakonec se vysušená peleta rozpustila v původním objemu ddH₂O.

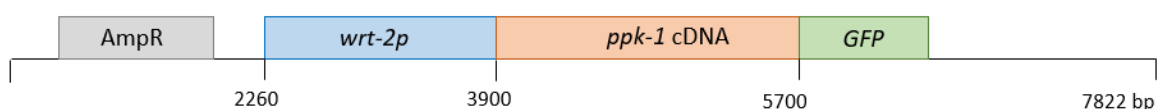
3.6. Vektory pro tkáňově specifickou nadprodukcí PPK-1

Pro přípravu plazmidů pro tkáňově specifickou nadprodukcí PPK-1 bylo zapotřebí spojit dva fragmenty. Prvním fragmentem byl promotor potřebný pro expresi sledované kinázy v daných buňkách – *wrt-2p* (buňky přijímající Wnt), *myo-3p* (svalové buňky) nebo *dpy-7p* (buňky hypodermis). Jako templát pro amplifikaci jednotlivých promotorů sloužila genomová DNA *C. elegans*. Druhým použitým fragmentem byl vektor pPD95.81 (Addgene plasmid 1497) nesoucí rezistenci na ampicilin, jenž sloužila jako selekční znak během klonování. Dále tento vektor obsahoval již vloženou cDNA pro *ppk-1* a GFP marker pro vizualizaci exprese. Zmíněné fragmenty byly syntetizovány podle standardního postupu (viz 3.5.2.1).

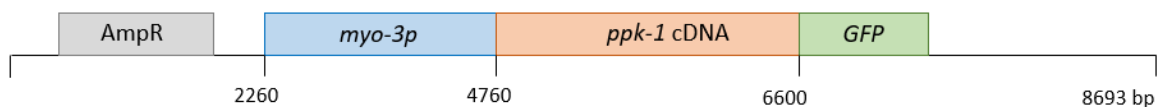
Pro nadměrnou expresi *ppk-1* v přijímajících buňkách byl promotor *wrt-2* amplifikován s použitím dvojice primerů *wrt2p-pPD-F* a *ppk-1-wrt2p-R*, a následně vložen do vektoru pPD95.81-*ppk-1* v poměru 3:2 ve prospěch vektoru. Ligovaný plazmid byl poté transformován do buněk DH5α (viz 3.5.2.3.) a šest kolonií bylo vybráno pro kontrolu restrikcí štěpením (viz 3.5.2.4.) s enzymy EcoRV a SacI. Po ověření správné inserce byl plazmid použit pro mikroinjekci do *C. elegans* (viz 3.4.).

Pro nadměrnou produkci PPK-1 i v jiných než Wnt produkujících a přijímajících buňkách jsme vybrali promotory genů *myo-3* a *dpy-7*. Fragment kódující promotor *myo-3* byl amplifikován s použitím dvojice primerů *myo3p-pPD-F* a *ppk1-my3p-R*, a promotor *dpy-7* s použitím *dpy7p-pPD-F* a *ppk1-dpy7p-R*. Připravené fragmenty byly poté ligovány Gibsonovou metodou (viz 3.5.2.2.). Hotové plazmidy byly otestovány metodou PCR (viz 3.5.2.1.), jejíž výsledek byl vizualizován elektroforetickou separací fragmentů DNA (viz 3.9.1.). Pouze bakteriální kolonie nesoucí plazmid s vloženým daným promotorem byly vybrány k izolaci plazmidové DNA (viz 3.5.2.4.), finálnímu ověření pomocí sekvenování DNA a mikroinjekci do živých jedinců *C. elegans* (viz 3.4.). Schémata připravených konstruktů zobrazuje Obr. 5 na následujících straně.

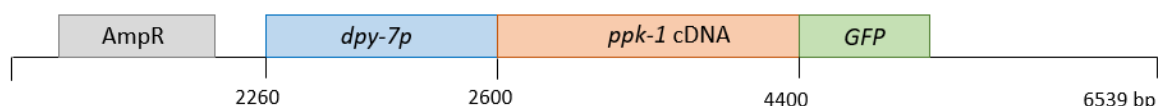
A) pPD95wrt-2p-ppk1



B) pPD95myo-3p-ppk1



C) pPD95dpy-7p-ppk1



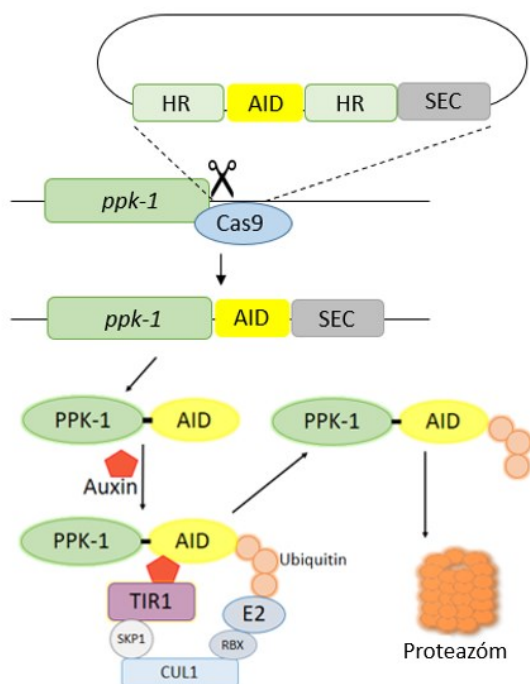
Obrázek 5. Linearizované mapy plazmidů použitých pro mikroinjekci do *C. elegans*. Vektory pro tkáňově specifickou nadprodukcii PPK-1 byly připraveny ligací plazmidu pPD95.81-ppk-1 a daným tkáňově specifickým promotorem (modrá). Výsledné vektory dále obsahovaly rezistenci na ampicilin (šedá) a kódující oblast pro GFP (zelená), jež byla navržena za kódující oblast pro *ppk-1* (oranžová). Připravili jsme tři různé konstrukty, a to pro nadměrnou produkci PPK-1 v A) buňkách přijímajících Wnt, B) ve svalových buňkách a C) v hypodermálních buňkách.

3.7. AID systém

K vytvoření linie pro tkáňově specifickou degradaci PPK-1 jsme využili AID systém (Zhang *et al.*, 2015). Zkratka metody vychází z anglického názvu „auxin inducible degradation“ a jedná se tedy o degradaci vyvolanou auxinem. Princip spočívá v tom, že sledovaný gen je pomocí metody CRISPR/Cas9 označený degronem (AID). Takto označený protein je rozeznáván vneseným proteinem TIR1, který interaguje s endogenními komponenty a utváří funkční ubikvitin ligázu. Označený protein je poté polyubikvitinován a následně degradován v proteazómu. Avšak TIR1 se váže na značený protein pouze za přítomnosti auxinu, degradace je tedy regulovatelná a také reverzibilní (Obr. 6).

Pro tento postup bylo zapotřebí vytvořit dvě odlišné linie *C. elegans*. Pro přípravu první linie bylo třeba připravit vektor nesoucí protein TIR1 exprimovaný pod tkáňově specifickým promotorem. Pro přípravu druhé linie bylo nutné navrhnout plazmid nesoucí naváděcí RNA (sgRNA) a protein Cas9, a také vytvořit plazmid obsahující kódující oblast pro AID, homologní

ramena (HR) pro úsek genu *ppk-1* a nesoucí také selekční kazetu (SEC). Samostatně ustanovené linie je pak možné křížit a vytvořit tak funkční AID „modul“.



Obrázek 6. Schématický model AID systému. Sledovaný gen (*ppk-1*) je pomocí metody CRISPR/Cas9 označený degenem (AID). Vnesený TIR1 exprimovaný pod tkáňově specifickým promotorem interaguje s endogenními proteiny a utváří tak funkční ubiquitin ligázu. Avšak pouze za přítomnosti auxinu se TIR1 váže na protein značený AID. Takto označený protein je poté polyubikvitinován a následně degradován v proteazómu (Zhang *et al.*, 2015).

3.7.1. Příprava linie nesoucí *wrt-2p::TIR1*

Linii exprimující protein TIR1 v buňkách produkujících Wnt (*egl-20p*), jsme měli již připravenou z předchozích pokusů. Zaměřili jsme se tedy na přípravu linie exprimující TIR1 v buňkách přijímajících signál Wnt. Při konstrukci plazmidu bylo nutné spojit dva fragmenty. Prvním fragmentem byl promotor, jenž by se expimoval v buňkách přijímajících Wnt, zvolili jsme *wrt-2p*. Druhým fragmentem byla část vektoru pLZ31 (Addgene plasmid 71720) nesoucí rezistenci na ampicilin a také fragment kódující oblast pro TIR1 a mRuby sloužící k vizualizaci exprese.

Tyto fragmenty jsme amplifikovali podle standardního postupu (viz 3.5.2.1.) s použitím dvojice primerů *wrt2p-pPD-F* a *TIR1 wrt2p-R* pro fragment promotoru, a *TIR1 cel-F* a *pPD95-R* pro amplifikaci plazmidu. Výjimkou byla změna v teplotě pro nasedání primerů, jenž jsme pro obě PCR změnili na 58 °C. Následně jsme fragment s *wrt-2p* spojili s fragmentem pLZ31 Gibsonovou metodou (viz 3.5.2.2.) v poměru 2:3 v nadbytku promotoru. Takto ligovaný plazmid jsme poté transformovali do buněk DH5α (viz 3.5.2.3.) a deset kolonií bylo vybráno pro kontrolu restrikčním štěpením (viz 3.5.2.4.) s enzymy EcoRI a BglII. Po ověření správné inserce byl plazmid použit pro injekci do *C. elegans* (viz 3.4.). Schéma připraveného konstruktů zobrazuje Obr. 7 na následující straně.

pPD95wrt-2p-TIR1



Obrázek 7. Linearizovaná mapa plazmidu pPD95wrt-2p-TIR1. Vektor pro degradaci PPK-1 v přijímajících buňkách byl připraven ligací dvou fragmentů – pPD95.81-TIR1 a promotoru *wrt-2* (modrá). Výsledný vektor navíc obsahoval rezistenci na ampicilin (šedá) a kódující oblast pro mRuby (červená), která byla navržena za kódující oblast pro protein TIR1 (žlutá).

3.7.2. Příprava *ppk-1* sgRNA

Prvním krokem pro přípravu druhé linie, potřebné pro tkáňově specifickou degradaci, byla příprava *ppk-1* sgRNA pro metodu CRISPR/Cas9. Amplifikace konstruktů *ppk-1* sgRNA se od standardního postupu (viz 3.5.2.1.) lišila sníženým počtem cyklů na 25. Pro PCR jsme využili dvojici primerů *ppk1_pDD162_sgRNA* a *pDD162sgins-uni-R* a jako templát vektor *pDD162* nesoucí kódující oblast pro Cas9 (Addgene plasmid 47549). Následně byl vzorek využit pro ligaci s ligázou T4 podle protokolu od výrobce (ThermoFisher) a potom transformován do DH5 α (viz 3.5.2.3.). Pro otestování správné ligace byly vybrány 2 kolonie, které byly rovnou ověřeny pomocí sekvenování DNA. Nakonec byl tento plazmid, obsahující Cas9 a *ppk-1* sgRNA, injikován společně s vektorem obsahujícím *ppk-1::AID* (viz 3.7.3.) do živých jedinců *C. elegans* (viz 3.4.).

3.7.3. Příprava plazmidu pJW1583-*ppk-1*

Dalším nezbytným krokem pro tvorbu druhé linie byla příprava plazmidu sloužícího k opravě dvouvláknového zlomu po štěpení proteinem Cas9, a to pomocí homologní rekombinace. Za tímto účelem bylo nutné spojit tři fragmenty – 3'HR a 5'HR a vektor *pJW1583* (Addgene plasmid 121054). Vektor *pJW1583* obsahuje SEC sloužící k selekci transgenních jedinců, která se skládá ze tří částí – genu rezistence na hygromycin, mutované alely *sqt-1(e1350)*, jenž způsobuje defektní vývoj kutikuly, což ústí ve viditelný fenotyp Rol, a rekombinázy Cre exprimované pod kontrolou promotoru *hsp-16.41*, který je indukovatelný tepelným šokem. Tento vektor byl nejdříve naštěpen restrikcí enzymy AvrII a SpeI, tímto štěpením byly odstraněny úseky *ccdB*, které jsou při následné ligaci nahrazeny homologními rameny. Reakce probíhala ve 37 °C přes noc. Poté se vzorek přečistil komerčním kitem DNA Clean and ConcentratorTM-5 (Zymo Research) a mohl se použít pro ligaci nebo skladovat ve 4 °C pro pozdější použití.

Současně jsme vytvořili jednotlivá HR pro *ppk-1* s přesahy potřebnými pro Gibsonovu ligaci. Za tímto účelem byly navrženy 4 primery, 2 pro každé rameno – pro 3'HR *ppk1-3arm-Flong* a *ppk1-3arm-R2long*, a pro 5'HR dvojice primerů *ppk1-5arm-Flong* a *ppk1-5arm-Rlong* (viz 3.5.1.). Pozice „reverse“ primeru pro 5'HR a „forward“ primeru pro 3'HR byly striktně dané umístěním selekční kazety. Pro amplifikaci se jako templát původně použila oblast genu *ppk-1* z genomové DNA z divokého typu laboratorního kmene *C.elegans* N2:

Na přípravu 1 PCR byly smíchány následující komponenty:

lyzační pufr.....10 µl

proteináza K.....0,1 µl

5-10 háďátek z kmene N2.

Natavení cyklu pro PCR: 65 °C.....1 hod

95 °C.....15 min

Bohužel jsme získali malé výtěžky jednotlivých HR, jejichž koncentrace by nebyly dostačující pro Gibsonovu ligaci. Proto jsme se rozhodli ligovat oblast genu *ppk-1* nejprve do vektoru pJET (ThermoFisher). Amplifikace proběhla podle standardních podmínek (viz 3.5.2.1.) a přečištěná sekvence *ppk-1* po PCR se vložila do klonovacího vektoru pJET1.2 podle postupu komerčního kitu CloneJET PCR cloning kit (ThermoFisher). Ligace probíhala přes noc v 15 °C. Následně jsme vzorek transformovali do bakterií (viz 3.5.2.3.) a pro otestování správné ligace jsme vybrali 2 kolonie, které se zkontrolovaly restričním štěpením (viz 3.5.2.4.) s enzymy XhoI a NcoI a ověřily sekvenováním DNA. Výsledný plazmid byl použit jako templát pro amplifikaci HR pro *ppk-1*.

Nasyntetizovaná a přečištěná HR byla vložena do linearizovaného vektoru pJW1583 s vyštěpenými úseky *ccdB*. Pro ligaci byl použit komerční kit Gibson assembly S^{E2611S} (New England Biolabs) s danými komponenty v následujícím poměru:

Gibs. mix.....10 µl

3'HR.....150 ng/ µl

5'HR.....150 ng/ µl

vektor pJW1583.....150 ng/ µl

Ligace probíhala v 50 °C 1 hod.

Následovala transformace do bakterií DH5α (viz 3.5.2.3.) a deset kolonií bylo vybráno pro kontrolu restričním štěpením (viz 3.5.2.4.) s enzymy BamHI a BglII. U výsledného plazmidu

musela být ještě provedena mutagenese pro vnesení bodové mutace v oblasti PAM (NGG motiv). Tento motiv je nezbytný pro štěpení substrátu Cas9 a mutace v této oblasti zabrání opětovnému štěpení proteinem Cas9 po úspěšné homologní opravě. Pro PCR se využila dvojice primerů *ppk1_pJW1583_PAMmut-F* a *ppk_pJW1583_PAMmut-R*, a byly změněny následující parametry – teplota nasedání primerů byla upravena na 58 °C a krok 2-4 v nastavení PCR probíhal pouze 25 cyklů. Po transformaci byly vybrány 2 kolonie, které se po izolaci (viz 3.5.2.4.) ověřily sekvenováním DNA. Po kontrole byl plazmid použit pro mikroinjekce do *C. elegans* (viz 3.4.) společně s vektorem nesoucí Cas9 a *ppk-1* sgRNA (viz 3.7.2.). Směs plazmidů použitých pro mikroinjekce byla smíchána podle doporučeného postupu (Dickinson *et al.*, 2015) v následujícím poměru:

Vektor pJW1583-*ppk-1*.....10 ng/μl

Vektor s Cas9 a *ppk-1* sgRNA.....50 ng/μl

myo-2p::tdTomato.....2,5 ng/μl

Směs plazmidů byla injikována do kmene *vps-29;muIs32*.

Nainjikovaní jedinci byli přendáni na nové misky s NGM, jež se kultivovaly ve 20 °C. Vnesený plazmid s Cas9 a *ppk-1* sgRNA způsobí zlom v jaderné DNA, který se opraví homologní rekombinací podle druhého vneseného plazmidu. Výslední jedinci ponесou sledovaný gen *ppk-1* označený degenem a také SEC pro rozeznání transgenních zvířat. Když byli jedinci ve stádiu L1-2 (po 2-3 dnech), tak se na každou misku s háďátky přidalo 500 μl hygromycinu ve finální koncentraci 250 μg/ml a 6.-7. den od injekce se takto ošetření jedinci zkontrolovali, jestli přežívají vystavení antibiotiku. Ti, kteří přežili, se ještě zkontrolovali na přítomnost dalšího selekčního znaku, a to fenotyp Rol, který se projevuje od stádia L3 defektním pohybem háďátek. Pokud jedinci vykazovali oba fenotypy, byli považováni za kandidáty, kteří nesli správně vloženou inzerci. Nicméně z nich bylo ještě zapotřebí vybrat homozygotní jedince, jejichž potomci vykazují úplnou dominanci v defektním fenotypu. Proto se potenciální jedinci přendali po jednom na nové misky s NGM bez hygromycinu a zkontrolovala se jejich generace F1 na 100% penetranci fenotypu Rol.

3.7.4. Transkripce *ppk-1* sgRNA *in vitro*

Prvním krokem byla syntéza templátu pro *ppk-1* sgRNA s využitím kombinace primerů *ppk1-sg1Ctag-T7* a *sgRNAuni-R* (viz 3.5.2.1.), jejíž produkt jsme následně použili pro transkripci *in vitro*. Transkripce byla provedena komerčním kitem HiScribe T7 (New England Biolabs) a reakční směs byla smíchána v následujícím poměru:

10x reakční pufr.....1,5 µl
 NTP.....1,5 µl od každého
 templát pro *ppk-1* sgRNA.....200 ng/µl
 RNA polymeráza T7.....1,5 µl
 Voda bez nukleáz....doplněno do 20 µl

Inkubace probíhala v 37 °C 16 hod. Směs byla přečištěna RNA Clean and Concentrator™-5 kit (Zymo Research) a poté byl přidán 1 µl 30mM Tris (pH 7,5) k 6 µl vzorku. Následně byla směs použita k injekci do živých jedinců *C. elegans* (viz 3.4.) společně s dalšími složkami v následujícím poměru:

myo-2p::tdTomato.....5 ng/µl
ppk-1 sgRNA (IVT).....400 ng/µl
 pJW1583-ppk-1.....100 ng/µl
 Cas9 (5µg/µl) (ThermoFisher).....1 µl
 ddH₂O.....doplněno do 10 µl

3.7.5. Indukce degradace proteinů auxinem

Agarové misky pro indukci degradace proteinu byly připraveny stejným způsobem jako pro běžnou kultivaci *C. elegans* (viz 3.2.2.), jen se po sterilizaci v autoklávu přidal auxin (Alfa Aesar, katalogové číslo A10556) ve finální koncentraci 1mM.

Dalším rozdílem oproti přípravě standardních misek s NGM bylo množství bakterií OP50 potřebných pro vyšetí. Bakterie se před vyšetím musely přibližně 10x zakoncentrovat, jelikož i při nízké koncentraci auxinu dojde ke snížení růstu bakterií. Následkem by byl nedostatek potravy pro hád'átka a tím pádem zpomalení jejich životního cyklu. Vzhledem k nestabilitě auxinu byly také auxinové misky skladovány nejdéle měsíc.

3.8. Mikroskopie

3.8.1. Příprava hád'átek pro mikroskopii

Mikroskopie byla prováděna pod fluorescenčním mikroskopem Leica DM6, využívající modré světelné spektrum pro excitaci GFP nebo zelené světelné spektrum pro excitaci RFP. Preparáty pro pozorování se připravovaly bezprostředně před vlastní mikroskopií. Hád'átka byla opláchnuta z misek s NGM pufrem M9 a přendána do zkumavky (1,5 ml). Následně se vzorek krátce centrifugoval a 5 µl pelety s hád'átkou se po kapkách nanoslo na sklíčko s 2% agarózou obsahující 30mM NaN₃, a poté překrylo krycím sklíčkem. Hád'átka byla tímto

způsobem znehybněna a bylo možné snadněji spočítat jedince a pozorovat jejich fenotyp. Pro úpravu obrázků z mikroskopu byl použit software FIJI (Schindelin *et al.*, 2012).

3.8.2. Analýza fenotypu QL

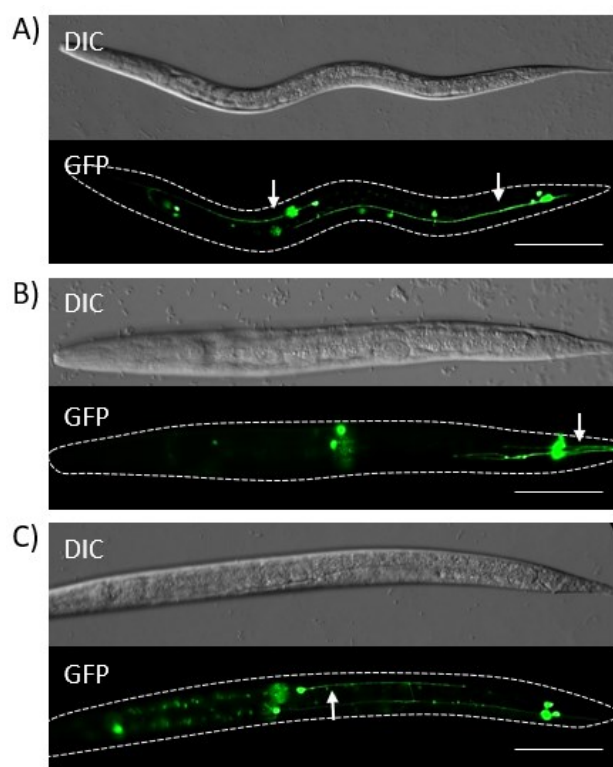
Jednou z možných metod, jak lze v postembryonálním vývoji *C. elegans* studovat signální dráhu Wnt, je analýza fenotypu QL. Signální dráha proteinu Wnt se u háďátek zapojuje do migrace specifické skupiny neuronů, konkrétně jejich prekursorů – neuroblastů Q (viz 1.3.1.). Kmeny obsahující transgen *muIs32* nebo *muIs35* (Ch'ng *et al.*, 2003) byly použity pro stanovení pozice dceřiné buňky QL. Oba transgeny obsahují *mec-7p::gfp*, pod kterým se zviditelní neuron PVM jako jeden z potomků QL (PQR, SDQL, PVM). Pokud je některý člen ze signální dráhy proteinu Wnt mutovaný, tak PVM migruje směrem k anterioru místo posteriorním směrem, což se označuje jako fenotyp QL. Pro rozlišení WT a fenotypu QL se posuzovala pozice PVM vzhledem k vulvě. Pokud byl PVM anteriorně od vulvy, byl jedinec považován za jedince s fenotypem QL.

V každém experimentu se hodnotilo prvních 50 (experimenty s RNAi) nebo 80-100 háďátek na sklíčku.

3.8.3. Polarita axonů ALM a PLM neuronů

Kromě výše zmíněné funkce signální dráhy Wnt u *C. elegans*, se tato dráha zapojuje i do určení polarit axonů některých neuronů – ALM, PLM. Za normálních okolností mají ALM a PLM bipolární axony, jeden velmi dlouhý anteriorním směrem a jeden velmi krátký posteriorním směrem. Pokud byla narušena aktivita některé z komponent signální dráhy proteinu Wnt, tak došlo k defektu ve vývoji axonů (Obr. 8). Pro vyhodnocování byly opět použity kmeny s transgenem *muIs32* nebo *muIs35*, které obsahují *mec-7p::gfp* exprimující se i v neuronech ALM a PLM. Jako fenotyp ALM se označoval stav, kdy jedinec měl posteriorní axon stejně dlouhý nebo delší než anteriorní. U neuronu PLM se označoval jako defektní fenotyp, když měl jedinec delší posteriorní axon než anteriorní.

V každém experimentu se hodnotilo nejméně 50 jedinců.



Obrázek 8. Polarizace axonů ALM a PLM neuronů. Na obrázcích je zobrazen mutantní kmen *mig-14(mu71)*. Tento kmen nese transgen *mul35*, ze kterého se exprimuje GFP v senzorických neuronech, mezi něž patří i ALM a PLM (navíc je zviditelněn i AVM a PVM). Tímto způsobem je umožněna jejich vizualizace pod fluorescenčním mikroskopem. A) Jedinci s WT fenotypem, u nichž proběhl přirozený vývoj neuronů a mají tak normálně orientované bipolární axony (bílé šipky). B) Fenotyp PLM, u něhož došlo k narušení funkce signalizace Wnt. Výsledkem je dlouhý axon v ocasní části (bílá šipka), který se deformuje, jelikož nemá dostatek prostoru pro růst tímto směrem. C) Fenotyp ALM, který se také vyznačuje obrácenou polaritou axonů (bílá šipka). U všech obrázků je antero-posteriorní osa zobrazena zleva doprava. Měřítka 100 μm .

3.8.4. DiI barvení

K obarvení speciální skupiny chemo-senzorických neuronů (amphidů a phasmidů) se použila barva DiI (ThermoFisher, katalogové číslo D282) v zásobní koncentraci 2 mg/ml. Hádátka ve stádiu L2-L3 se opláchla z agarových misek pufr M9 a přendala se do zkumavky (1,5 ml). Po centrifugaci se peleta resuspendovala v 1 ml pufru M9 a přidalo se 5 μl zásobního roztoku DiI (poměr ředění 1:200). Následně se hádátka inkubovala 3 hod při pokojové teplotě, poté se 2x opláchla čerstvým pufr M9 a přenesla na novou agarovou misku s NGM, aby se zbavila nadbytečné barvy DiI. Na miskách se ponechala 20-30 min a nakonec se z nich hádátka opět opláchla pufr M9 a pozorovala pod fluorescenčním mikroskopem (viz 3.8.1.). Jako pozitivní kontrola DiI barvení se posuzovalo obarvení amphidů v hlavové části. Za defektní fenotyp se bral stav, kdy se jeden nebo oba phasmidy nacházející se v ocasní části neobarvily.

V každém experimentu se hodnotilo 80-100 jedinců.

3.9. Ostatní

3.9.1. Separace fragmentů DNA po PCR

Pro separaci fragmentů DNA se použil agarózový gel s pufr Tris/Borát/EDTA (TBE). Používaná koncentrace agarózového gelu byla 1%. Pro zviditelnění fragmentů DNA pod UV světlem bylo zapotřebí přidat etidium bromid do agarózového gelu. Vzorky s DNA byly

smíchány se vzorkovacím pufrem (3 ml glycerolu, 25 mg bromfenolové modři a doplněno do 10 ml ddH₂O). Pro správné určení velikosti fragmentu DNA bylo nezbytné přidat příslušný DNA žebřík (1kb DNA ladder od ThermoFisher). Separace většinou probíhala při 90-100 V.

Za účelem izolace fragmentů DNA byl použit agarózový gel s Tris/Acetát/EDTA (TAE) a následně použit komerční kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid).

Na přípravu 5x koncentrovaného TBE byly smíchány následující přísady do uvedené finální koncentrace:

89mM Tris pH 7,6

89mM H₃BO₃

2mM EDTA

3.9.2. Mražení kmenů *C. elegans*

Pro dlouhodobé skladování a zachování linií *C. elegans* se dané kmeny zamrazily. Hád'átka (především ve stádiu L1) se opláchla 2 ml pufrem M9 z misek s NGM a přendala do zkumavky. Následně se obsah doplnil mrazícím roztokem do 4 ml, a nakonec se směs rozdělila po 1 ml do zamrazovacích zkumavek, jež se skladovaly v -80 °C nebo tekutém dusíku.

Na přípravu 1 litru mrazícího roztoku byly smíchány následující přísady:

NaCl.....5 g

1M KH₂PO₄ (pH 6,0).....50 ml

glycerol.....240 ml

H₂O.....710 ml

Sterilizováno v autoklávu a následně přidáno 0,3 ml 1M MgSO₄.

3.9.3. Roztoky

Lyzační pufr

Používá se pro izolaci genomové DNA. Následující přísady byly smíchány do uvedené finální koncentrace:

10mM Tris pH 8,3

2,5mM MgCl₂

50mM KCl

0,45% NP-40 a 0,45% Tween 20

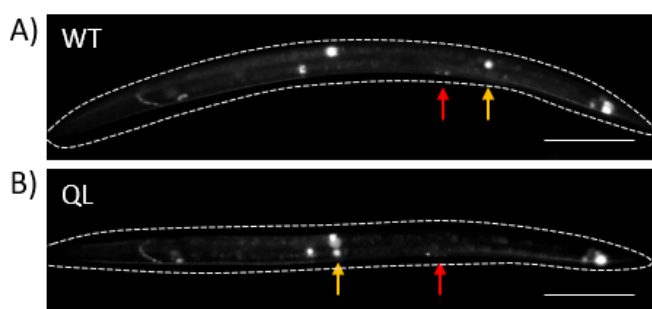
Pro lyzi hád'átek a izolaci DNA se před použitím přidalo 100µg/ml proteinázy K.

4. Výsledky

4.1. Genetické interakce *ppk-1* s komponenty signální dráhy Wnt

Předběžné experimenty prověřující nové kandidátní geny zapojené do regulace signalizace Wnt u *C. elegans* odhalily možné zapojení kinázy PPK-1 (Macůrková, nepublikováno). Experimenty se prováděly v naší laboratoři, a to metodou RNA interference (RNAi). Tento buněčný proces reguluje transkripci genu prostřednictvím dvouvláknové RNA (dsRNA), která je rozštěpena na siRNA, jež následně interferuje s homologním transkriptem cílového genu a tím znemožňuje jeho expresi. U *C. elegans* může být dsRNA vnesena prostřednictvím injekce (Fire *et al.*, 1998), namáčením v roztoku obsahující dsRNA (Tabara *et al.*, 1998), produkcí z transgenů (Tavernarakis *et al.*, 2000) nebo krmením bakteriemi exprimující dsRNA (Timmons *et al.*, 2001). V naší laboratoři se využívá poslední zmíněná metoda (viz 3.3.). Následně se účinek RNAi na dráhu Wnt vyhodnocoval pomocí analýzy fenotypu QL, jež sleduje rozdíl v penetranci fenotypu QL mezi negativní kontrolou a testovaným genotypem (viz 3.8.2.). Pokud nedojde k rozdílu, tak daný gen pravděpodobně nemá vliv na signalizaci Wnt. Avšak když dojde k signifikantnímu snížení nebo navýšení penetrance fenotypu QL, tak to značí možné zapojení sledovaného genu do regulace signální dráhy Wnt.

Pilotní experimenty se prováděly v senzitivovaném pozadí, ve kterém již byla narušena funkce jedné z komponent regulující signalizaci Wnt, konkrétně jednoho proteinu retromerového komplexu – VPS-29. Mutovaná alela *vps-29* způsobuje vadnou recyklaci proteinu MIG-14/Wls a tím pádem sníženou sekreci ligandu EGL-20/Wnt z produkující buňky (Yang *et al.*, 2008). Použitá linie také nesla transgen *muIs32*, který umožňuje vizualizovat některé dceřiné buňky neuroblastu QL a napomáhá tak k vyhodnocení fenotypu QL (Obr. 9). Po provedení RNAi s *ppk-1* došlo k navýšení fenotypu QL (data neukázána), což naznačuje vliv PPK-1 na migraci neuroblastu QL a tím možné zapojení do regulace signální dráhy proteinu Wnt. Gen *ppk-1* byl proto vybrán pro detailnější studium.



Obrázek 9. Výsledná pozice PVM z potomků QL. Na obrázcích je zobrazen mutantní kmen *vps-29(tm1320)*. Tento kmen nese transgen *muIs32*, ze kterého se exprimuje GFP v senzorických neuronech, mezi něž patří i jeden z potomků neuroblastu QL – PVM (navíc jsou zviditelněny i AVM, ALM, PLM). Tímto

způsobem lze sledovat fenotyp pod fluorescenčním mikroskopem. A) WT fenotyp, kdy neuron PVM (žlutá šipka), u něhož dojde k expresi *mab-5*, je lokalizován posteriorně od vulvy (červená šipka). B) Ukázka fenotypu QL, kdy je narušená signální dráha proteinu Wnt. Výsledkem je obrácená migrace neuronu PVM (žlutá šipka), který migruje anteriorně od vulvy. U všech obrázků je antero-posteriorní osa zobrazena zleva doprava. Měřítko 100 μ m.

Rozhodli jsme se ověřit, zda *ppk-1* geneticky interaguje i s dalšími komponenty signální dráhy proteinu Wnt, nejen s *vps-29*. Bohužel dostupná mutantní alela *ppk-1(ok1411)* způsobuje u hád'átka letalitu (Weinkove *et al.*, 2008), nebylo tedy možné testovat vliv úplné ztráty funkce *ppk-1*. Provedli jsme proto experimenty s *ppk-1* RNAi, které umožňují alespoň částečné snížení exprese cílového genu. RNAi jsme prováděli v kmenech nesoucích mutace v různých komponentech dráhy Wnt. Volili jsme takové mutace, které se projevují jen částečnou penetrancí fenotypu QL, aby bylo možné sledovat případnou změnu penetrance po RNAi s *ppk-1*. Jako negativní kontrolu pro RNAi jsme použili bakterie nesoucí prázdný vektor L4440 a jako pozitivní kontrolu jsme použili bakterie obsahující vektor s kódující oblastí genu *snx-3* (protein se účastní recyklace MIG-14 v produkujících buňkách (Harterink *et al.*, 2011)). Účinek RNAi jsme opět vyhodnocovali sledováním procentuální penetrance fenotypu QL (viz 3.8.2.).

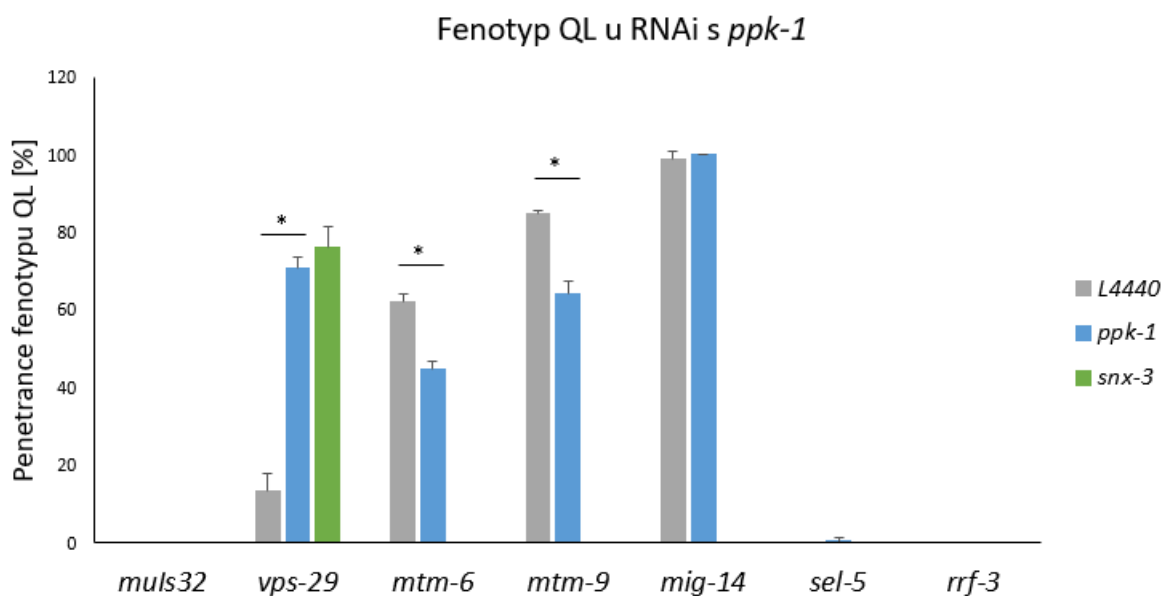
Všechny použité kmeny obsahovaly transgeny *mul32* nebo *mul35*, které umožňují vizualizaci dceřiné buňky neuroblastu QL. Jako první jsme testovali mutantní kmen *vps-29* použitý v předběžných pokusech. VPS-29 se účastní recyklace MIG-14 v produkující buňce (Yang *et al.*, 2008). Dále jsme testovali kmeny s mutacemi v genech *mtm-6* a *mtm-9* (PI(3)P fosfatázy z rodiny myotubularinů), jejichž produkty mají také roli v internalizaci MIG-14 (Silhankova *et al.*, 2010). Čtvrtou testovanou komponentou byl samotný MIG-14 mající klíčovou roli v sekreci ligandu EGL-20. Dalším testovaným kmenem byl kmen s mutací v genu *sel-5*, jehož funkce byla také popsána v buňkách produkujících Wnt (Macůrková a Knop, nepublikováno).

Jako poslední kmen jsme vybrali kmen s mutací v genu *rrf-3*, který sice nehraje roli v signalizaci Wnt, ale kmen je velmi senzitivní na RNAi. Důvodem citlivosti je ztráta RNA dependentní RNA polymerázy RRF-3 (Simmer *et al.*, 2002). Fenotypy RNAi u *rrf-3* jsou často silnější a ve srovnání s kmenem divokého typu se více přibližují projevu nulové mutace. Pro kontrolu jsme do ověření ještě zahrnuli i divoký kmen nesoucí pouze *mul32*, jelikož všechny testované kmeny obsahovaly tento transgen. Výjimkou byl kmen s mutací v *mig-14*, který nese transgen *mul35*, nicméně se jedná o podobnou variantu, transgen je pouze integrován na jiném chromozomu.

Výsledky experimentů s RNAi jsou shrnuty v Obr. 10. Nejdříve jsme si tedy u mutantního kmene *vps-29* ověřili, že snížením exprese *ppk-1* dochází k nárůstu fenotypu QL, tak jak bylo pozorováno v předběžných experimentech. Dále jsme pozorovali, že v pozadích *mtm-6* a *mtm-9* po RNAi s *ppk-1* došlo ke snížení penetrance fenotypu QL oproti negativní kontrole. U jedinců nesoucích mutace v *sel-5* a *mig-14* jsme nepozorovali žádnou změnu v penetranci fenotypu QL mezi hád'átky krmenými prázdným plazmidem L4440 a konstruktem s *ppk-1* RNAi. A nakonec

u senzitivního kmene *rrf-3* jsme neidentifikovali žádné defekty, až na vyšší úmrtnost háďátek po ošetření bakteriemi nesoucí fragment *ppk-1* (data neukázána).

Výsledky ukazují, že snížená exprese *ppk-1* se na migraci neuroblastu QL negativně projeví nejen v mutantním pozadí *vps-29*, ale i v dalších případech, kdy je snížená aktivita signální dráhy Wnt. Samotná ztráta exprese *ppk-1* ale migraci neuroblastu QL neovlivní. Z těchto experimentů však nelze jednoznačně odvodit, v jaké fázi regulace signalizace Wnt by mohla být kináza PPK-1 zapojena.



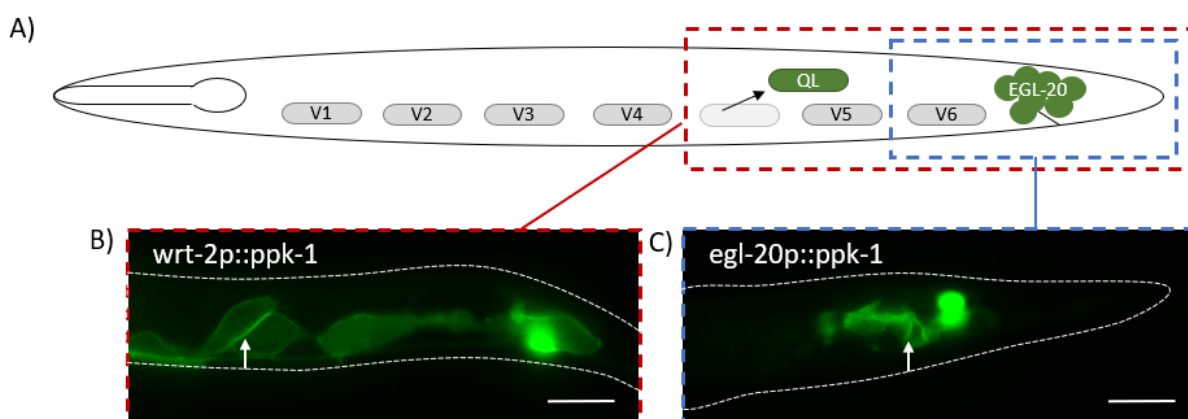
Obrázek 10. Penetrance fenotypu QL po RNAi s *ppk-1* v různých mutantních pozadích. Grafy ukazují procentuální míru penetrance fenotypu QL u RNAi s *ppk-1* (modrý sloupec) v porovnání s negativní kontrolou nesoucí prázdný vektor L4440 (šedý sloupec). Experiment byl proveden v různých mutantních pozadích - *vps-29*, *mtm-6*, *mtm-9*, *mig-14*, *sel-5*, *rrf-3*. Většina kmenů obsahovala transgen *muls32*, proto byl použit kmen pouze s tímto transgenem jako kontrola. Jelikož byla pozorování u všech kmenů prováděna zároveň, byla pozitivní kontrola RNAi se *snx-3* měřena pouze u kmene *vps-29(tm1320);muls32* pro kontrolu účinnosti RNAi. Sloupce představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů s 50 zvířaty v každém měření, chybové úsečky představují směrodatné odchylky. Data byla analyzována nepárovým Studentovým t-testem ($p < 0,05$).

4.2. Tkáňově specifická nadprodukce PPK-1

Jak bylo popsáno výše, ověřili jsme si zapojení *ppk-1* do regulace signální dráhy proteinu Wnt. Než jsme mohli začít uvažovat o možné úloze této kinázy v signalizaci Wnt, potřebovali jsme zjistit, v jaké části dráhy hraje PPK-1 roli. Zejména jsme chtěli zjistit, jestli se jedná o buňky produkující nebo přijímající signál Wnt. Proto jsme provedli tkáňově specifickou nadprodukci PPK-1 v těchto buňkách.

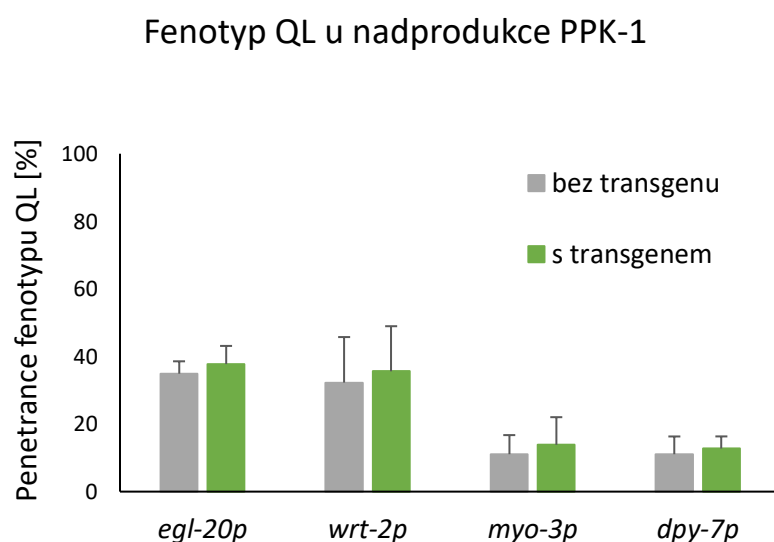
Připravili jsme linii exprimující *ppk-1* pod kontrolou promotoru *wrt-2*, který je aktivní v buňkách přijímajících signál Wnt (Obr. 11). V tomto případě se jedná o neuroblast QL, který vzniká během asymetrického dělení buňky V5. QL následně migruje přes tento prekursor hypodermálních buněk směrem k posterioru, kde se dále dělí a dává vznik senzoriickým neuronům (viz 1.3.1). Linii, kde je nadměrně produkovaná kináza PPK-1 v buňkách produkujících Wnt, jsem dostala již připravenou z předběžných experimentů. Exprese *ppk-1* byla provedena pod kontrolou promotoru *egl-20*, který se exprimuje v produkujících buňkách nacházejících se v ocasní části v oblasti rekta (Obr. 11). Promotory byly vybrány na základě dat z databáze Wormbase.

V obou případech byla nadměrně produkovaná kináza označena rovněž GFP pro snazší kontrolu exprese a konstrukty byly injikovány do mutantního pozadí *vps-29*, kde je již snížená aktivita signální dráhy proteinu Wnt. Jelikož se jedná o extrachromozomální konstrukt, který se nezačleňuje do chromozomů a nedědí se tedy se stoprocentní účinností, tak v rámci jedné linie nacházíme jedince s transgenem, ale i bez něho. Proto jsme po přípravě vzorku pro mikroskopii (viz 3.8.1.) mohli pozorovat na jednom sklíčku jak negativní kontrolu, tak sledované jedince s připraveným transgenem, obě skupiny pocházející ze stejné linie.



Obrázek 11. Nadprodukce PPK-1 v produkujících a přijímajících buňkách. A) Schématické znázornění umístění buněk produkujících EGL-20 a lokalizace neuroblastu QL. B) Kmen exprimující *ppk-1::GFP* pod promotorem *wrt-2* v přijímajících buňkách. V tomto případě se jedná o neuroblast QL (bílá šipka), kdy je na obrázku zachycena jeho časná migrace přes hypodermální buňku V5 posteriorním směrem. K expresi dochází i v hypodermálních buňkách V. C) Exprese *ppk-1::GFP* pod promotorem *egl-20*. Buňky produkující EGL-20 (bílá šipka) se nacházejí v ocasní části *C. elegans* v oblasti kolem rekta. U obou kmenů lze pozorovat lokalizaci PPK-1 na plazmatickou membránu buňky (bílá šipka). U všech obrázků je antero-posteriorní osa zobrazena zleva doprava. Měřítko 10 μm .

Povedlo se nám připravit 3 linie s extrachromozomálním konstruktem *wrt-2p::ppk-1*, u kterých jsme nejdříve ověřili expresi PPK-1, a poté penetranci fenotypu QL. Jelikož u všech linií byla viditelná exprese PPK-1 v přijímající buňce a nebyl mezi nimi pozorován rozdíl ve sledovaném fenotypu (data neukázána), tak byla pro další experimenty vybrána pouze jedna linie. U této linie a již dříve připravené linie nesoucí konstrukt *egl-20p::ppk-1* jsme provedli mikroskopickou analýzu fenotypu QL, kterou jsme následně kvantifikovali (Obr. 12). U obou linií lze pozorovat, že PPK-1 lokalizuje na plazmatickou membránu (Obr. 11). Bohužel nadměrná produkce PPK-1 v produkujících ani v přijímajících buňkách nevedla k významnému rozdílu v penetranci fenotypu QL v porovnání s negativní kontrolou.



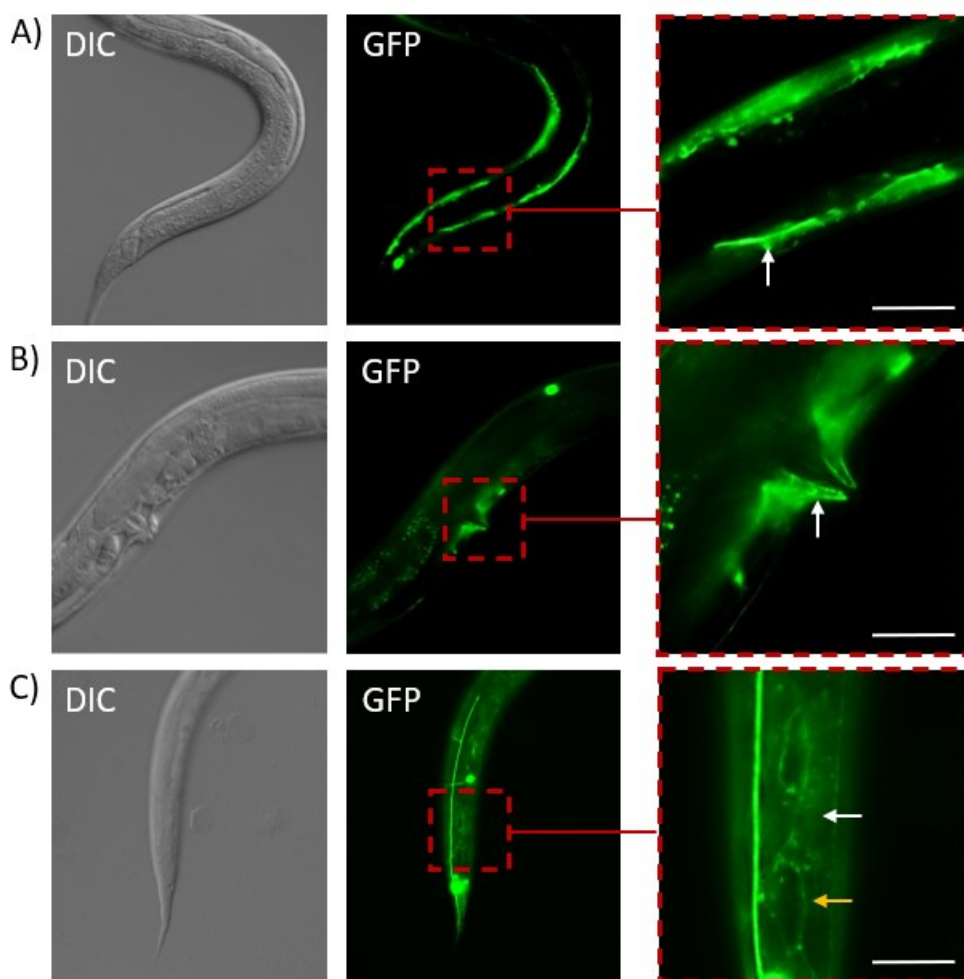
Obrázek 12. Tkáňově specifická nadprodukce PPK-1.

Vektory s *ppk-1::GFP* pod různými promotory byly injikovány do mutantního pozadí *vps-29; mulS32*, které vykazuje variabilitu v penetranci fenotypu QL. Nadměrná produkce PPK-1 byla sledována v buňkách produkujících (*egl-20p*) nebo přijímajících signál Wnt (*wrt-2p*), a dále ve svalových buňkách (*myo-3p*) nebo buňkách

hypodermis (*dpy-7p*). Na grafech je vynesena penetrance fenotypu QL u transgenních jedinců (zelený sloupec) a jedinců bez transgenů (šedý sloupec). U žádné linie nebyl pozorován rozdíl mezi negativní kontrolou a jedinci s nadměrně produkovanou kinázou PPK-1. Sloupce představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů s 80-100 zvířaty v každém experimentu, chybové úsečky představují směrodatné odchylky. Data byla analyzována nepárovým Studentovým t-testem ($p < 0,05$).

Kromě produkujících a přijímajících buněk by PPK-1 mohla aktivitu dráhy Wnt ovlivňovat také v průběhu transportu proteinu Wnt mezi produkující a přijímající buňkou. Rozhodli jsme se tedy ověřit i tuto alternativu. Jako první možnost jsme si zvolili svalové buňky, kdy jsme exprimovali *ppk-1* pod kontrolou promotoru *myo-3* (Obr. 13). Jako druhou možnost jsme vybrali potenciální transport přes buňky hypodermis. Za tímto účelem jsme exprimovali *ppk-1* pod promotorem *dpy-7* (Obr. 13). Tyto promotory jsme opět zvolili podle údajů z databáze Wormbase.

V obou případech byl opět protein PPK-1 označen GFP a konstrukty byly injikovány do mutantního pozadí *vps-29*. Povedlo se nám připravit dvě linie s extrachromozomálním konstruktem *myo-3p::ppk-1* a jednu linii obsahující *dpy-7p::ppk-1*. V těchto liniích jsme nejdříve ověřili expresi PPK-1 v daných buňkách. U jedinců exprimujících PPK-1 ve svalových buňkách jsme pozorovali, jak tato kináza lokalizuje opět na plazmatickou membránu svalových buněk (Obr. 13). Exprese PPK-1 v hypodermálních buňkách probíhala, ale membránová lokalizace šla hůře rozeznat, jelikož se jedná o syncytium obklopující buňky V1-V6 (Obr. 13). U popsanych linií jsme po mikroskopickém pozorování provedli analýzu fenotypu QL. Bohužel ani u těchto linií nedošlo ke změně v penetranci fenotypu QL mezi jedinci nesoucími extrachromozomální konstrukt a negativní kontrolou (Obr. 12).



Obrázek 13. Nadprodukce PPK-1 ve svalových a hypodermálních buňkách. A-B) Kmen exprimující *ppk-1::GFP* pod promotorem *myo-3* (A) ve svalových buňkách ohraničujících tělo a (B) v buňkách vulvy. V obou případech lze pozorovat lokalizaci PPK-1 na plazmatické membráně u zmíněných buněk (bílá šipka). C) Exprese *ppk-1::GFP* pod promotorem *dpy-7*, jenž se exprimuje v kutikule a hypodermálních buňkách tvořících syncytium (bílá šipka) okolo buněk V1-V6 (žlutá šipka) umístěných v podélné řadě na levé a pravé straně *C. elegans* v antero-posteriorní ose. Měřítko 10 μ m.

4.3. Tkáňově specifická degradace PPK-1

Jelikož nám tkáňově specifická nadprodukce PPK-1 nepřinesla jednoznačný výsledek, rozhodli jsme se využít opačný přístup, a to tkáňově specifickou degradaci. Za tímto účelem jsme chtěli využít systém AID (Zhang *et al.*, 2015). Pro tuto metodu je zapotřebí vždy zkřížit dvě linie. První linie nese cílový gen, v našem případě *ppk-1*, označený degenem AID. Druhá potřebná linie obsahuje protein TIR1 exprimovaný pod příslušným promotorem pro zacílení degradace jen do konkrétních buněk.

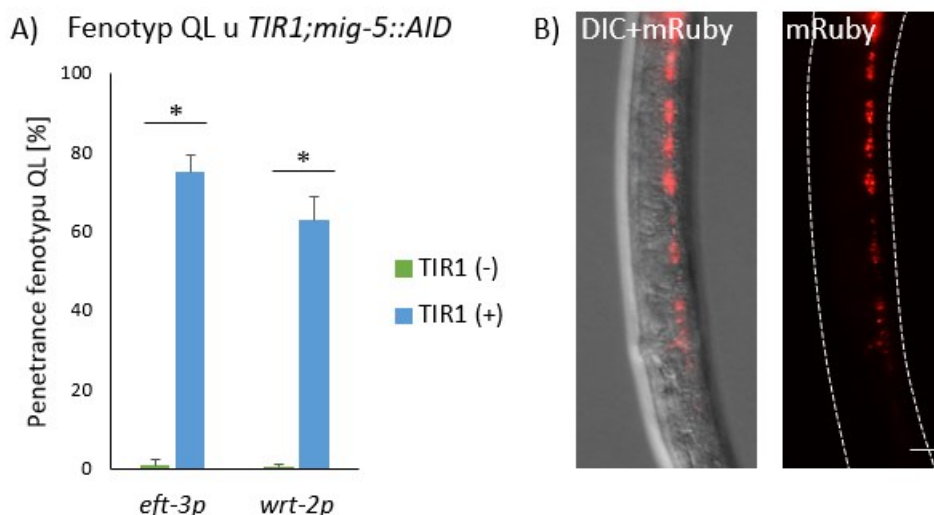
4.3.1. Exprese TIR1 v přijímajících buňkách

Nejdříve jsme se rozhodli připravit linie exprimující TIR1 v příslušných buňkách. Linii pro studium degradace v buňkách produkujících Wnt (*egl-20p::TIR1*) jsme měli již připravenou z předchozích pokusů. Zaměřili jsme se proto na přípravu linie exprimující TIR1 v buňkách přijímajících Wnt (*wrt-2p*). Jelikož jsme tou dobou ještě neměli připravenou linii nesoucí PPK-1 označenou degenem AID, rozhodli jsme se otestovat účinnost připraveného konstruktů s jiným členem signální dráhy Wnt.

Za tímto účelem jsme připravený vektor obsahující konstrukt *wrt-2p::TIR1* injikovali do linie nesoucí degenem označený protein MIG-5 (Heppert *et al.*, 2018). Protein MIG-5 je u *C. elegans* homologem pro savčí protein Dvl účastnící se transdukce signálu v buňkách přijímajících signál Wnt (Walston *et al.*, 2006). Podařilo se nám připravit 1 linii, která exprimovala TIR1 v linii V buněk (Obr. 14). Účinnost degradace proteinu MIG-5 v přítomnosti TIR1 v buňkách přijímajících Wnt jsme sledovali pomocí analýzy fenotypu QL. Vizualizace tohoto fenotypu byla umožněna díky transgenu *mul35*. Transgen nesoucí *wrt-2p::TIR1* byl v linii udržován v extrachromozomální formě, která vede k tomu, že se v jedné linii vyskytují transgenní jedinci a jedinci neobsahující transgen. Jedinci bez transgeny slouží jako negativní kontrola. Očekávali jsme, že pokud je konstrukt funkční, dojde k degradaci MIG-5 v přijímajících buňkách, což se projeví defektní migrací PVM. Po přidání auxinu skutečně došlo u jedinců exprimujících TIR1 v přijímajících buňkách k signifikantnímu nárůstu v penetranci fenotypu QL (Obr. 14), konstrukt *wrt-2p::TIR1* tak fungoval dle očekávání.

Nově vytvořenou linii nesoucí *wrt-2p::TIR1* jsme dále porovnali s linií, kde byl TIR1 exprimovaný pod kontrolou promotoru *eft-3*, rovněž v kombinaci s *mig-5::AID*. Tato linie již byla v laboratoři připravena dříve (Hábová, 2020). Linie s konstruktem *eft-3p::TIR1* vykazuje o něco vyšší penetranci fenotypu QL u transgenních jedinců ošetřených auxinem v porovnání s linií nesoucí *wrt-2p::TIR1* (Obr. 14). Promotor *eft-3* je nicméně aktivní ve všech tkáních *C. elegans* a pro určení tkáňové specifity účinku genů dráhy Wnt není vhodný. Specifická

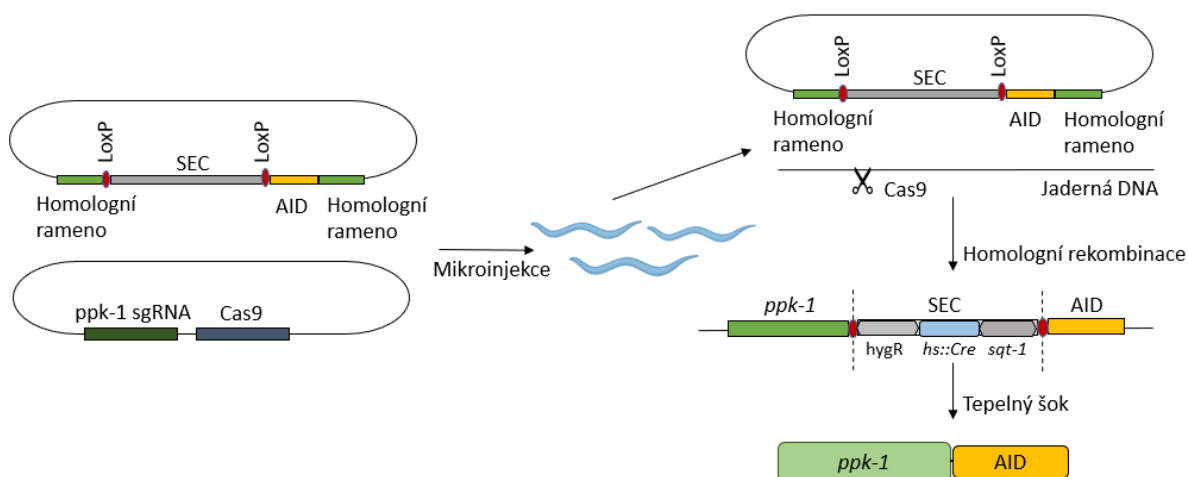
exprese TIR1 z *wrt-2p* se v tomto srovnání jeví jako dostatečně účinná pro degradaci v buňkách přijímajících Wnt a vhodná pro další experimenty.



Obrázek 14. Ověření funkce *wrt-2p::TIR1* v linii exprimující degronem označený protein MIG-5/Dvl. A) Na grafu je vynesena penetrance fenotypu QL u jedinců nesoucích TIR1 (modrý sloupec) a bez TIR1 (zelený sloupec) v pozadí *mig-5::AID; muls35*. Linie, kde byl TIR1 exprimován pod promotorem *eft-3* posloužila jako pozitivní kontrola. Sloupce představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů s 80-100 zvířaty v každém měření, chybové úsečky představují směrodatné odchylky. Data byla analyzována nepárovým Studentovým t-testem ($p < 0,05$). B) Expresa TIR1 pod kontrolou promotoru *wrt-2* v hypodermální V linii, jejíž buňky se nacházejí v podélné řadě na levé a pravé straně těla. Měřítko 10 μ m.

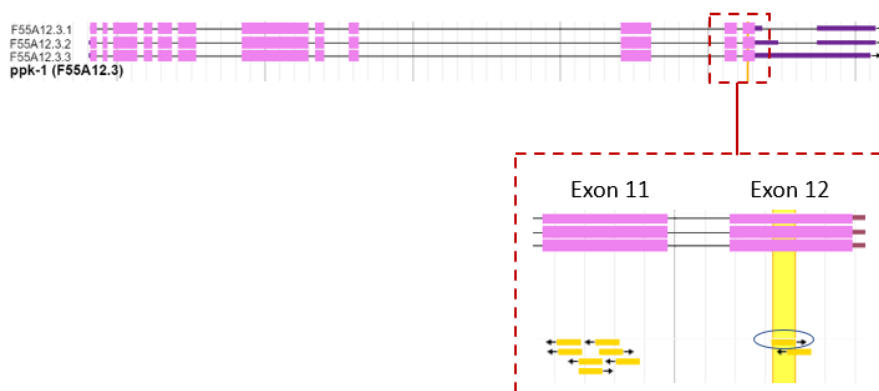
4.3.2. Linie nesoucí *ppk-1::AID*

Pro přípravu druhé linie potřebné pro tkáňově specifickou degradaci bylo nutné navrhnout dva plazmidy. Prvním byl plazmid nesoucí Cas9 a příslušnou *ppk-1* sgRNA. Tento konstrukt sloužil k vytvoření dvouvláknového zlomu v jaderné DNA v oblasti našeho sledovaného genu (*ppk-1*). Druhý navrhnutý vektor obsahoval SEC pro rozeznání transgenních jedinců, oblast kódující degron AID a homologní ramena ke genu *ppk-1* sloužící k opravě zlomu v DNA pomocí homologní rekombinace. Po injekci zmíněných konstruktů do živých jedinců *C. elegans* tímto způsobem dojde k označení cílového genu degronem AID (Obr. 15).



Obrázek 15. Schématické znázornění přípravy linie nesoucí *ppk-1::AID*. Vektor nesoucí SEC, AID a HR pro *ppk-1*, společně s druhým plazmidem, jenž obsahuje Cas9 a *ppk-1* sgRNA, je injikován do živých jedinců *C. elegans*. U nich by potom mělo dojít ke zlomu v jaderné DNA, který by měl být opraven homologní rekombinací. Výsledným produktem bude linie nesoucí sledovaný gen označený AID. Navíc ponese selekční kazetu (rezistenci na hygromycin, fenotyp Rol, rekombinázu Cre), již je možné následně vystříhnout působením rekombinázy Cre indukovatelné tepelným šokem.

Nejdříve jsme se zaměřili na přípravu *ppk-1* sgRNA, která umožňuje zacílit štěpení v jaderné DNA proteinem Cas9 v oblasti kódující *ppk-1*. Za tímto účelem bylo nutné vybrat cílovou oblast pro protein Cas9. Sekvence *ppk-1* obsahuje 12 exonů, přičemž oblast pro cílovou oblast pro Cas9 jsme zvolili na C-koncové části, kde se nachází exon 11 a 12. Pro návrh *ppk-1* sgRNA jsme využili <http://genome.sfu.ca/crispr/>. Program nám navrhl několik potenciálních cílových sekvencí, z nichž jsme vybrali možnost, která vykazovala nejvhodnější parametry. Všechny navržené sekvence na jedenáctém exonu měly záporné hodnoty pro energii potřebnou pro složení sekundární struktury. Tyto sekvence jsme vyloučili, jelikož záporné hodnoty značí snadnější vytvoření sekundární struktury, což by mohlo snížit účinnost metody CRISPR/Cas9. Zaměřili jsme se tedy na poslední exon, v kterém obě navržené sekvence pro *ppk-1* sgRNA vykazují kladné hodnoty, z nichž jsme vybrali tu, která je na kódujícím vlákně (Obr. 16). Následně jsme tuto sekvenci pro sgRNA vložili do plazmidu nesoucího i sekvenci pro protein Cas9.



Obrázek 16. Návrh *ppk-1* sgRNA. Gen *ppk-1* obsahuje 12 exonů. Pro náš experiment jsme vybrali cílovou sekvenci pro Cas9 navrženou na C-konci ve dvanáctém exonu.

Současně jsme připravovali vektor pro homologní rekombinaci. Bohužel původně navržená homologní ramena v optimální doporučené délce 500-700 bp (Dickinson *et al.*, 2015) se nepodařilo naamplifikovat, museli jsme proto ramena prodloužit na 600-900 bp. U výsledného konstruktů byla ještě provedena mutagenese potřebná pro zabránění opětovného štěpení opravené DNA proteinem Cas9. Po přípravě tohoto plazmidu byly oba popsané konstrukty injikovány do mutantního pozadí *vps-29;mul32*. Provedli jsme 70-80 úspěšných mikroinjekcí, kdy injikovaná směs viditelně vstupovala do gonády a nainjikovaní jedinci přežívali. Bohužel po ošetření hygromycinem, který slouží jako jeden ze selekčních znaků, se nepodařilo získat žádné přeživší hád'átka.

Důvodem mohl být neefektivní přepis *ppk-1* sgRNA nebo Cas9 z plazmidu. Proto jsme se rozhodli eliminovat závislost *ppk-1* sgRNA a Cas9 na přepisu z plazmidu a provedli jsme transkripci *in vitro* (viz 3.7.4). V tomto případě jsme nasyntetizovali *ppk-1* sgRNA (viz 3.5.2.1.) s naváděcí sekvencí komplementární k úplnému konci exonu 12. Pokud by v tomto místě došlo k úspěšné opravě, sekvence pro nasednutí sgRNA by se ztratila, neboť by byla přerušena vloženým degronem AID. Cas9 by tak nemohla znovu nasednout a štěpit DNA, nebylo proto nutné dělat dodatečnou mutagenesi konstruktů. Výsledný transkript jsme použili pro nové mikroinjekce společně s dalšími komponenty pro mikroinjekční směs (viz 3.7.4.). Bohužel ani v tomto případě nainjikovaná hád'átka nepřežívala po přidání hygromycinu.

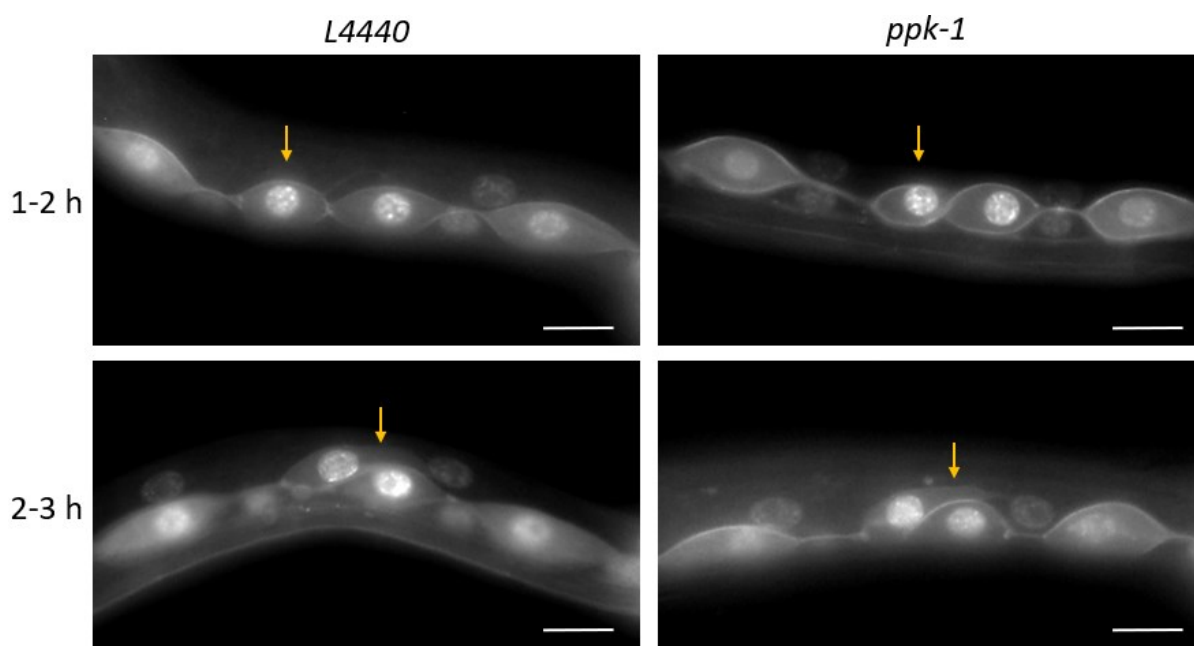
I přes naši velkou snahu se nám bohužel nepodařilo připravit tuto linii. Nemohli jsme proto provést následující kroky potřebné pro vytvoření výsledné linie určené k tkáňově specifické degradaci PPK-1.

4.4. Časná polarizace a migrace neuroblastu QL

Přestože jsme předpokládali vliv PPK-1 na migraci neuroblastu QL prostřednictvím regulace signální dráhy proteinu Wnt, alternativní možností byla účast PPK-1 v nastavení časné polarizace a migrace neuroblastu QL. Tento krok předchází rozhodnutí o směru migrace

závislém na signálu Wnt (shrnutí Rella *et al.*, 2016). Jelikož se nám nepodařilo jasně potvrdit účast v pozdní fázi migrace, rozhodli jsme se proto ověřit možné zapojení PPK-1 v časné polarizaci a migraci neuroblastu QL.

K ověření možného vlivu PPK-1 na iniciální fázi migrace jsme využili kmen s mutací v genu *vps-29* a nesoucí transgen *heIs63* (Wildwater *et al.*, 2011). Z transgenu *heIs63* se exprimuje doména PH označená GFP pod kontrolou promotoru *wrt-2*, která tak slouží k vizualizaci plazmatické membrány linie hypodermálních buněk V včetně neuroblastů Q. Dále tento transgen nese histon H2B, také označený zeleným fluorescenčním proteinem, který umožňuje zviditelnit jádra buněk. Tento kmen byl ošetřen buď bakteriemi pro RNAi s prázdným plazmidem L4440, který posloužil jako negativní kontrola, nebo bakteriemi pro RNAi s fragmentem *ppk-1* (Obr. 17).



Obrázek 17. Iniciální polarizace a migrace neuroblastu QL. Pro vizualizaci buněk V1-V6 a QL byl využit kmen *vps-29;mulS32;heIs63*, který umožňuje zviditelnit jádro a plazmatickou membránu buněk. Neuroblast QL polarizuje a migruje (žlutá šipka) směrem k posterioru přes hypodermální buňku V5. V levém sloupci jsou jedinci ošetření kontrolní RNAi, v pravém jedinci po působení RNAi s *ppk-1*. V experimentu se vyhodnocoval fenotyp u 25-30 jedinců pro každé ošetření. U všech obrázků je antero-posteriorní osa zobrazena zleva doprava. Měřítko 10 μm .

Nezbytnou součástí této analýzy je přesná synchronizace jedinců. Proto se gravidní jedinci přendali na misky pro RNAi (viz 3.3.) a počkalo se, až nakladou embrya. Poté se vylíhlá hád'átka v L1 stádiu odebírala po 1-2 h nebo 2-3 h po vylíhnutí a následně mikroskopovala. Porovnávali jsme pak časnou polarizaci neuroblastu QL u hád'átek krmených prázdným

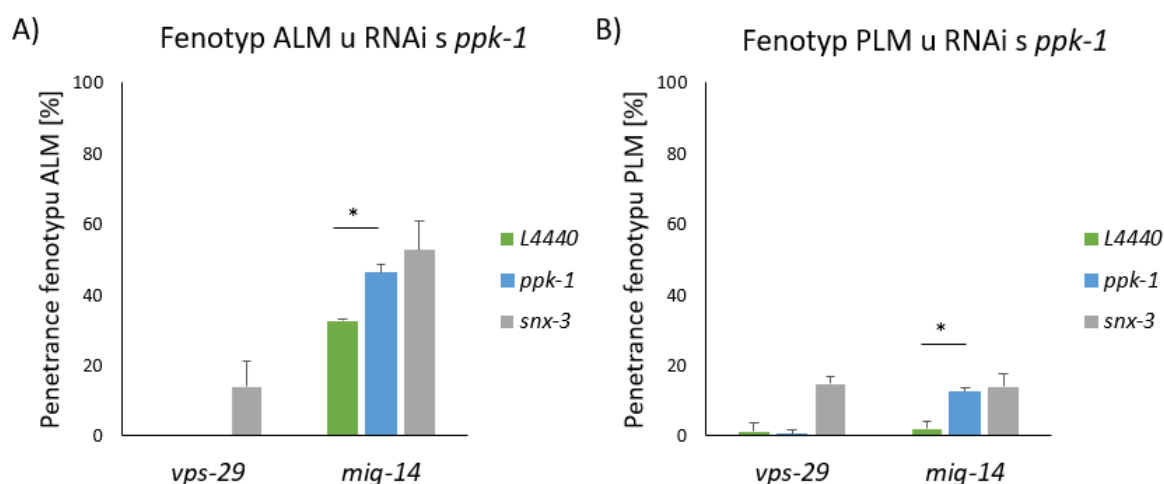
plazmidem L4440 nebo konstruktem *ppk-1* RNAi v odpovídajících časových bodech. V obou případech došlo k normální situaci, kdy QL polarizuje a migruje přes buňku V5 směrem k posterioru (Obr. 17). Účinnost RNAi jsme si ověřili analýzou fenotypu QL u jedinců pocházejících ze stejné agarové misky, z které byli odebíráni jedinci pro pozorování časné polarizace a migrace (data neukázána).

4.5. Vliv PPK-1 na polaritu axonů ALM a PLM neuronů

Dosud popsané pokusy se zaměřovaly na migraci neuroblastu QL, která je závislá na signální dráze Wnt řízené ligandem EGL-20/Wnt. Nicméně *C. elegans* má pro molekulu Wnt pět homologů – EGL-20, CWN-1, CWN-2, MOM-2, LIN-44. K expresi genů pro Wnt dochází v různých buňkách a tím je umožněno vytvoření částečně se překrývajícího rozložení exprese podél celé antero-posteriorní osy (shrnutí Sawa & Korswagen, 2013). Zajímalo nás, zda se snížení exprese *ppk-1* projeví i v dějích závislých na jiných proteinech Wnt nebo zda je vliv PPK-1 omezen na působení EGL-20.

Jako první jsme pro studium této teorie zvolili analýzu ALM a PLM (viz 3.8.3.). Kromě migrace dceřiných buněk neuroblastu u QL, se signalizace Wnt podílí na vývoji další skupiny senzorických neuronů. Jedná se o neurony ALM a PLM jejichž polarizace axonů v antero-posteriorní ose je řízena hned několika homology pro Wnt. Za normálních podmínek mají ALM a PLM bipolární axony, kdy jeden je mnohem delší a směřuje k přední části těla, a druhý velmi krátký, který směřuje k zadní části těla. Na polarizaci ALM se účastní CWN-1, CWN-2 a EGL-20, zatímco LIN-44, CWN-1 a EGL-20 působí redundantně na orientaci PLM (Hilliard & Bargmann, 2006; Pan *et al.*, 2006; Prasad & Clark, 2006).

Pro analýzu jsme opět využili experimenty s RNAi v pozadí mutací snižujících aktivitu signalizace Wnt (viz 4.1.). U všech jsme porovnali polaritu axonů ALM a PLM neuronů po RNAi s fragmentem *ppk-1* a negativní kontrolou. Pouze u *mig-14;muIs35* jsme pozorovali statisticky významnou změnu v polarizaci axonů (Obr. 18). U jedinců s mutantní alelou *mig-14(mu71)* došlo k signifikantnímu navýšení penetrance jak fenotypu ALM, tak PLM. U kmene *vps-29;muIs32* došlo ke změně polarity axonů PLM jen u pozitivní kontroly, stejně jako u fenotypu ALM (Obr. 18). U ostatních testovaných mutantních pozadí (*mtm-6*, *mtm-9*, *sel-5*, *muIs32* a *rrf-3*) jsme nepozorovali změnu nebo poškození ve vývoji neuronů ALM a PLM (data neukázána).



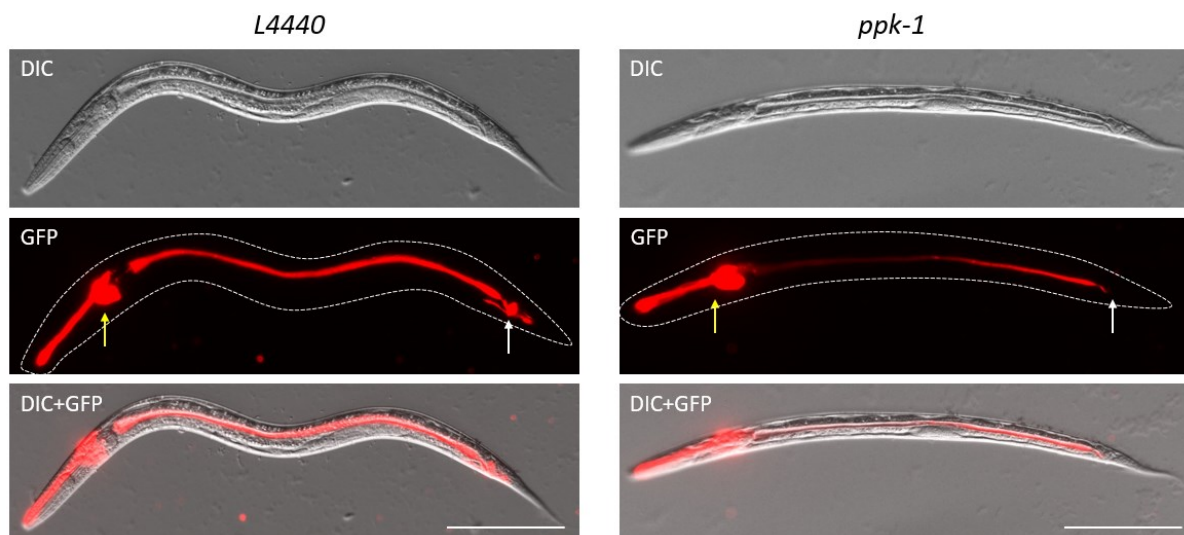
Obrázek 18. Penetrance fenotypu ALM a PLM po RNAi s *ppk-1* u *vps-29;muIs32* a *mig-14;muIs35*. Grafy ukazují procentuální míru penetrance (A) fenotypu ALM nebo (B) fenotypu PLM po RNAi s *ppk-1* (modrý sloupec) v porovnání s negativní kontrolou nesoucí prázdný vektor L4440 (zelený sloupec) a pozitivní kontrolou (šedý sloupec). V mutantním pozadí *mig-14* došlo k navýšení defektů v polarizaci axonů jak u ALM, tak PLM neuronů. Sloupce představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů s 50 zvířaty v každém experimentu, chybové úsečky představují směrodatné odchylky. Data byla analyzována nepárovým Studentovým t-testem ($p < 0,05$).

4.6. Vliv PPK-1 na asymetrické dělení buňky T

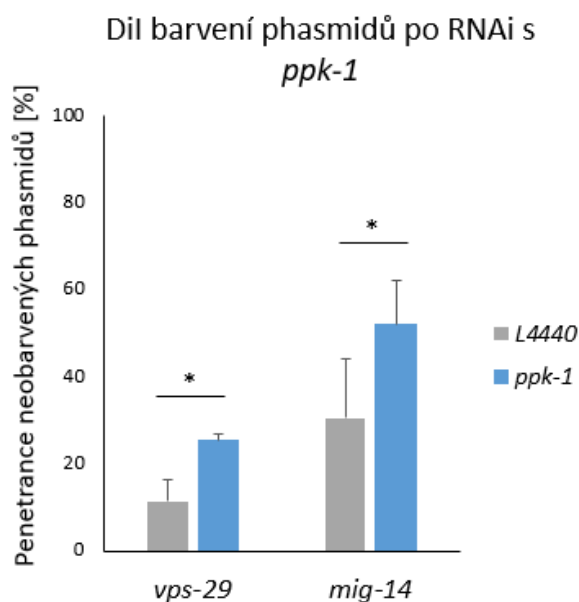
Dalším vývojovým dějem, jenž je závislý na signální dráze Wnt, je asymetrické dělení buňky T, které je řízeno ligandem LIN-44 (Herman *et al.*, 1995). Buňky T se nacházejí v ocasní části těla *C. elegans*, jedna na levé straně a druhá na pravé. Asymetrickým dělením vznikají dvě různé dceřiné buňky. První dává vznik buňkám epidermis a druhá generuje nervové buňky, mezi něž patří i gliové buňky (T.paa a T.pap). Tyto podpůrné buňky neuronů tvoří kanály v ocasní části hád'átka, umožňující přímý kontakt mezi okolím a chemo-senzorickými neurony, phasmidy (shrnutí Inglis *et al.*, 2018).

Na základě výsledků předchozího experimentu jsme pro analýzu vývoje buňky T vybrali pouze kmeny s mutacemi ve *vps-29* a *mig-14*, jelikož u těchto dvou kmenů došlo k defektní polarizaci axonů PLM, na jejichž vývoj redundantně působí i LIN-44. Očekávali jsme proto, že pokud má *ppk-1* vliv na signalizaci Wnt řízenou LIN-44, tak dojde k narušení ve vývoji buněk T.paa a T.pap. To je možné hodnotit prostřednictvím barvení DiI (viz 3.8.4.). Pokud byly tyto gliové buňky správně vyvinuté, tak došlo k obarvení phasmidů, v opačném případě se neobarvily (Obr. 19), jelikož se barva DiI z vnějšího prostředí nedostala k neuronům. Pro kontrolu účinného barvení jsme sledovali, jestli jsou u jedince obarvené amphidy nacházející se v hlavové části a mající stejné chemo-senzorické vlastnosti jako phasmidy v ocasní části.

Barvení DiI jsme prováděli po RNAi s *ppk-1* a jako negativní kontrolu jsme použili bakterie nesoucí prázdný vektor L4440. Jak u *vps-29(tm1320)*, tak *mig-14(mu71)* došlo po RNAi s bakteriemi nesoucími *ppk-1* k mírnému, ale signifikantnímu navýšení jedinců s defektním vývojem buněk T.paa a T.pap (Obr. 20). Častějším pozorovaným fenotypem byl jeden neobarvený phasmid (data neukázána).



Obrázek 19. DiI barvení phasmidů. V levém sloupci jsou jedinci ošetření kontrolní RNAi s *L4440*, u kterých jsou T.paa a T.pap správně vyvinuté, a proto během barvení DiI dojde k obarvení phasmidů (bílá šipka) fluorescenční barvou DiI. Naopak v pravém sloupci jsou jedinci po působení RNAi s *ppk-1*, u nichž je narušena signalizace Wnt, čímž dojde k defektnímu vývoji T.paa a T.pap, které neutvoří kanál potřebný pro kontakt neuronů s okolím, a tím pádem se phasmidy neobarví (bílá šipka). Pro zobrazení fenotypů byl využit kmen *vps-29;mul32* a jako kontrola účinnosti metody DiI se posuzovaly obarvené amphidy (žlutá šipka). U všech obrázků je antero-posteriorní osa zobrazena zleva doprava. Měřítka 100 μ m.



Obrázek 20. DiI barvení phasmidů po RNAi s *ppk-1*.

Graf ukazuje procentuální míru penetrance absence obarvených phasmidů po RNAi s *ppk-1* (modrý sloupec) v porovnání s negativní kontrolou nesoucí prázdný vektor L4440 (šedý sloupec). V mutantním pozadí *vps-29;mul32* i *mig-14;mul35* došlo k navýšení počtu neobarvených phasmidů. Sloupce představují průměrné hodnoty ze čtyř nezávislých experimentů s 80-100 zvířaty v každém experimentu, chybové úsečky představují směrodatné odchylky. Data byla analyzována nepárovým Studentovým t-testem ($p < 0,05$).

5. Diskuze

V této práci jsme se pokusili přinést nový pohled na regulaci velmi důležité diferenciační a homeostatické signální dráhy. Signalizaci Wnt jsme sledovali u modelového organismu *C. elegans*, které je ve srovnání s vyššími organismy poměrně méně složité a je dobře prozkoumané, proto je vhodným modelem právě pro studium signálních drah. Za účelem identifikace nových regulačních proteinů byly provedeny v naší laboratoři předběžné experimenty, jež odhalily, že snížená exprese *ppk-1* pomocí RNAi v mutantním pozadí *vps-29* vede k narušení migrace neuroblastu QL.

PPK-1 je u *C. elegans* jediným zástupcem z rodiny PIP5K, která je primárně zodpovědná za produkci PI(4,5)P₂ v buňce. U savčího modelu už byl popsán mechanismus zapojení PIP5K do regulace signální dráhy proteinu Wnt, který by mohl fungovat i u háďátka v buňce přijímající signál Wnt (Tanneberger *et al.*, 2011). Nicméně u *C. elegans* nejsou přítomny LRP5/6 a Amer1 z uvedeného savčího modelu a doposud není známo, jestli jejich roli přebírají jiné proteiny nebo zda signalizace u *C. elegans* požadavek na tyto proteiny nějakým způsobem obchází. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda se PPK-1 skutečně účastní regulace signální dráhy Wnt u *C. elegans*, popřípadě jsme chtěli zjistit možný mechanismus zapojení této kinázy.

5.1. Genetické interakce *ppk-1* se členy signální dráhy proteinu Wnt

Předběžné výsledky o možné úloze *ppk-1* v signální dráze Wnt byly získány v podmínkách již částečného narušení signalizace Wnt. Nejdříve jsme se proto rozhodli otestovat, za jakých podmínek je PPK-1 pro signalizaci Wnt nezbytná, tedy zda samotná ztráta *ppk-1* má vliv na aktivitu dráhy Wnt, nebo zda se vliv ztráty *ppk-1* projeví jen za specifických podmínek. Dostupná mutace v genu *ppk-1*, alela *ok1411* je tvořena delecí prvních osmi exonů a představuje zřejmě nulovou mutaci, vede ale k zastavení životního cyklu v larválním stádiu háďátka. K zástavě sice dojde po dokončení vývoje nervového systému, nicméně vzhledem k možnému maternálnímu vlivu se použití této alely jevílo jako nevhodné pro naše studie (Weinkove *et al.*, 2008). Využili jsme tedy RNAi, která vede jen ke snížení exprese *ppk-1*.

Zjistili jsme, že RNAi s *ppk-1* u divokého kmene nezpůsobuje žádné defekty v migraci QL. Stejného výsledku jsme dosáhli i v případě použití kmene s mutací v genu *rrf-3*, který je díky nefunkční RNA dependentní RNA polymeráze velmi senzitivní k RNAi. Použitím tohoto kmene lze často simulovat úplnou ztrátu funkce sledovaného genu. To, že je kmen citlivější, jsme si ověřili, neboť jsme zaznamenali vyšší míru sterility po ošetření RNAi s *ppk-1*, což je v souladu s předchozími zjištěními, že PPK-1 je důležitá pro ovulaci a embryonální vývoj (Xu

et al., 2007; Weinkove *et al.*, 2008). V případě fenotypu QL však žádná změna pozorována nebyla.

Výsledky těchto experimentů tak naznačily, že v podmínkách, kdy je signální dráha proteinu Wnt plně funkční, nemá snížení exprese *ppk-1* na její aktivitu negativní vliv. Nicméně tento závěr je třeba brát s rezervou. Rozsáhlá studie využívající mutantní kmen *rrf-3* pro experimenty s RNAi s bakteriálními klony z knihovny RNAi sice odhalila řadu nových genů, jejichž ztráta vedla k různým vývojovým vadám, ale nebyly v ní pozorovány fenotypy QL ani ALM/PLM (Simmer *et al.*, 2002). Přestože by tento kmen měl být účinným nástrojem pro odhalení nových regulátorů určité dráhy, metoda RNAi vykazuje variabilitu v projevech různých fenotypů. Bylo například popsáno, že buňky nervového systému jsou vůči RNAi málo citlivé, a tak fenotypy související s funkcí nervových buněk nemusí být vždy odhaleny (Kamath *et al.*, 2001; Timmons *et al.*, 2001; Asikainen *et al.*, 2005). Je tak možné, že ani v pozadí *rrf-3* mutace se nám nepodařilo dosáhnout kompletního odstranění transkriptu *ppk-1* a i malá zbytková aktivita PPK-1 je dostatečná pro její úlohu v signální dráze Wnt.

Ve všech experimentech s RNAi jsme využili metodu, v níž jsou jedinci krmeni bakteriemi pro RNAi produkující danou dsRNA (*ppk-1*). Což přináší výhody jako je jednoduchost provedení a ovlivnění mnoho jedinců, naopak nevýhodou je nekontrolovatelné množství vnesené dsRNA, které může vést k variabilitě ve sledovaném fenotypu (Kamath *et al.*, 2001). Tento problém by bylo možné odstranit rozdílným vnesením dsRNA, například mikroinjekcí *in vitro* připravené dsRNA. Dalším z možných vysvětlení, proč se ztráta *ppk-1* negativně neprojeví na signalizaci Wnt, by mohla být kompenzace jinou kinázou. Nicméně tato možnost není v souladu s tím, že u *C. elegans* byl identifikován pouze jeden člen rodiny PIP5K, který je zodpovědný za produkci PI(4,5)P2 (Weinkove *et al.*, 2008).

V následujících experimentech jsme se zaměřili na testování úlohy *ppk-1* v prostředí, kde již je funkce signalizace Wnt částečně narušena. Pro ověření genetických interakcí *ppk-1* s dalšími komponenty signalizace Wnt jsme vybrali 5 různých genů, jejichž proteiny se podílí na sekreci proteinu Wnt z produkujících buněk – *vps-29*, *mtm-6*, *mtm-9*, *mig-14* a *sel-5*. V prvních třech testovaných mutantních pozadích došlo po ošetření bakteriemi pro RNAi nesoucími fragment *ppk-1* k signifikantnímu rozdílu v penetranci fenotypu QL ve srovnání s negativní kontrolou. Zatímco v mutantním pozadí *vps-29* došlo k nárůstu jedinců vykazujících fenotyp QL, tak v pozadí *mtm-6* a *mtm-9* došlo ke snížení penetrance fenotypu QL.

Ztráta funkce retromerového komplexu, jehož je protein VPS-29 součástí, vede k omezení recyklace MIG-14 a tím ke snížení sekrece proteinů Wnt (Yang *et al.*, 2008). Zvýšení

penetrance fenotypu QL po RNAi s *ppk-1* naznačuje, že by se PPK-1 rovněž mohla podílet na regulaci účinné sekrece proteinů Wnt, například na úrovni endocytózy MIG-14. Tomu ale částečně odporuje výsledek RNAi s *ppk-1* v pozadí *mtm-6* a *mtm-9*. MTM-6 a MTM-9 jsou PI(3)P fosfatázy účastníci se recyklace MIG-14 z endozómů zpět do Golgiho aparátu (Silhankova *et al.*, 2010). Ztráta funkce *mtm-6* a *mtm-9* vede v obou případech k vysokému počtu jedinců s defektní migrací QL, zatímco když jsou tito mutanti krmeni bakteriemi pro RNAi produkující dsRNA *ppk-1*, dojde až k 20% poklesu v penetranci fenotypu QL. Pokud by se PPK-1 podílela na účinné recyklaci MIG-14, očekávaný výsledek experimentu by měl být spíše opačný, podobně jako v případě RNAi s *ppk-1* v mutantním pozadí *vps-29*. Data však naznačují, že snížená exprese *ppk-1* dokáže kompenzovat nepřítomnost zmíněných fosfatáz.

Jedním z možných vysvětlení, jež se nabízí je, že *ppk-1* působí rovněž v buňkách produkujících signál Wnt a ovlivňuje rovnováhu v produkci jednotlivých fosfoinositidů. Důležitost rovnováhy v hladině fosfoinositidů byla ukázána například právě v případě MTM-6 a MTM-9, jejichž ztrátu je pro účely recyklace MIG-14 možné kompenzovat současným snížením aktivity PI3 kinázy – VPS-34 (Silhankova *et al.*, 2010). Problémem s touto možností je, že se obě fosfatázy MTM účastní regulace jiných fosfoinositidů než PPK-1, nicméně metabolismus fosfoinositidů je navzájem provázaný a ovlivnění hladiny jednoho fosfoinositidu může ovlivnit i hladinu jiného (Wallroth & Haucke, 2018).

Dalším možným vysvětlením, za předpokladu, že by se PPK-1 účastnila recyklace MIG-14, by mohla být alternativní dráha, která se aktivuje, pokud jsou PPK-1 i fosfatázy MTM inaktivní. Pokud by PPK-1 hrála roli v přijímající buňce, dala by se snížená penetrance fenotypu QL v pozadí MTM mutantů vysvětlit například zvýšeným počtem receptorů Frizzled na membráně v důsledku snížené endocytózy, což by pak mohlo kompenzovat sníženou sekreci ligandu Wnt. Nicméně pak by se dal stejný efekt očekávat i u mutantů v genu *mig-14*, kde po RNAi s *ppk-1* k žádnému snížení penetrance fenotypu QL nedošlo, rovněž u mutantů v genu *vps-29*, kde naopak došlo k navýšení penetrance ve sledovaném fenotypu. Toto vysvětlení se tak nezdá být pravděpodobné.

Experimenty s RNAi nám ukázaly, že *ppk-1* interaguje s více členy signální dráhy proteinu Wnt a tím pádem utvrzuje naši teorii o zapojení PPK-1 v této signalizaci. Zdá se, že za normálních okolností není PPK-1 nezbytná pro správný přenos signálu Wnt, ale pokud dojde ke snížení sekrece ligandu Wnt, jako je tomu v mutantních pozadích *vps-29*, *mtm-6* a *mtm-9* nebo *mig-14*, tak se projeví potřeba kinázy PPK-1 v regulaci signální dráhy Wnt.

5.2. Stanovení vlivu PPK-1 na regulaci signální dráhy proteinu Wnt

Pro pochopení výše popsaných interakcí bylo nezbytné zjistit, v které části signální dráhy proteinu Wnt je kináza PPK-1 zapojena. Jak již bylo zmíněno, PPK-1 je jedinou kinázou u *C. elegans* fosforylující PI(4)P na PI(4,5)P₂ (Weinkove *et al.*, 2008). Tento fosfoinositid je velmi důležitý pro endocytózu (Jost *et al.*, 1998), jež je schopna ovlivňovat signalizaci Wnt jak v buňkách produkujících signál Wnt, tak v buňkách přijímajících signál Wnt.

V produkujících buňkách by PPK-1 mohla regulovat recyklaci MIG-14/Wls z povrchu buňky. K té dochází endocytózou zprostředkovanou klatrinem (Pan *et al.*, 2008a; Port *et al.*, 2008), která je iniciována vazbou adaptorového proteinu 2 (AP-2) na plazmatickou membránu právě v oblastech bohatých na PI(4,5)P₂. Vazba tohoto bisfosfátu s AP-2 způsobí konformační změnu AP-2. Aktivní konformace tohoto proteinu následně rekrutuje klatrin potřebný pro vytvoření endocytických váčků. Dokonce je vytvořena i pozitivní zpětná vazba, kdy AP-2 aktivuje PIP5K, čímž se zvedne produkce PI(4,5)P₂. Vyšší hladiny bisfosfátu podporují další rekrutování klatrinu a tvorbu klatrinového váčku (Krauss *et al.*, 2006), jenž slouží k transportu nákladu (například MIG-14) z plazmatické membrány zpět do buňky (Pan *et al.*, 2008a).

Co se týká funkce kinázy PPK-1 v přijímajících buňkách, tak u savčího modelu již byl popsán mechanismus, kterým PIP5K reguluje signální dráhu proteinu Wnt. Vazba ligandu Wnt na receptorový komplex Fz-LRP5/6 vede přes protein Dvl ke tvorbě PI(4,5)P₂. Obohacení tohoto fosfoinositidu na plazmatické membráně v oblasti aktivovaných receptorů zahájí hromadění Amer1, jenž rekrutuje destrukční komplex k membráně. Tím nejen dojde k inhibici tohoto komplexu, ale současně je umožněna fosforylace LRP5/6 a další přenos signálu (Tanneberger *et al.*, 2011). Nicméně, jak bylo zmíněno výše, u *C. elegans* nejsou přítomny Amer1 a LRP5/6 a není tedy jasné, jakým mechanismem, by mohla být PPK-1 zapojena. Jednou z možností by mohl být podobný mechanismus, který by však využíval jiné proteiny či interakce. Alternativně by PPK-1 mohla inhibovat transdukcii signálu pomocí internalizace receptoru Fz, opět endocytózou zprostředkovanou klatrinem.

Tkáňově specifickou roli PPK-1 jsme nejprve testovali nadměrnou expresí PPK-1 v EGL-20 produkujících a přijímajících buňkách. Tuto metodu jsme zvolili na základě studie věnující se též *ppk-1* u *C. elegans*, v které nadměrná produkce PPK-1 vedla k defektnímu vývoji některých neuronů (Weinkove *et al.*, 2008). Očekávali jsme, že pokud má PPK-1 vliv buď na sekreci EGL-20 nebo na přenos signálu v buňkách přijímajících EGL-20, tak dojde po nadměrné produkci PPK-1 v příslušných buňkách k narušené migraci PVM z QL dceřiných

potomků. U žádné z vytvořených linií jsme bohužel nepozorovali rozdíl v penetranci fenotypu QL u transgenních jedinců v porovnání s jedinci neobsahujícími transgen.

Jedním z možných vysvětlení by mohl být nefunkční extrachromozomální konstrukt a tím pádem špatná exprese PPK-1. Nicméně v obou případech jsme byli schopni detekovat nadprodukcí PPK-1 v daných buňkách a dokonce jsme pozorovali, jak kináza označená GFP lokalizuje na plazmatické membráně, stejně jako bylo popsáno v jiných studiích (Xu *et al.*, 2007; Weinkove *et al.*, 2008). Samotná lokalizace na plazmatickou membránu sice není důkazem enzymatické aktivity, avšak ukazuje, že protein je správně exprimován a lokalizován, dá se tedy předpokládat, že je i enzymaticky aktivní. Další možností je, že nadprodukce PPK-1 v produkujících ani přijímajících buňkách nemá vliv na migraci PVM (fenotyp QL). To by mohlo naznačovat jiný mechanismus, kterým by PPK-1 regulovala signální dráhu proteinu Wnt.

Takovým možným mechanismem by mohla být regulace transportu mezi produkujícími a přijímajícími buňkami. Provedli jsme proto tkáňově specifickou nadprodukcí PPK-1 ve svalech (*myo-3p*) a v epidermis (*dpy-7p*). V těchto buňkách by mohla PPK-1 hrát roli opět v endocytóze ligandu EGL-20, konkrétně ve formování gradientu. To, že EGL-20 vytváří gradient, bylo v literatuře popsáno (Coudreuse *et al.*, 2006). Mechanismus endocytózy EGL-20 by ale mohl fungovat v případě formování gradientu zřejmě pouze na krátkou vzdálenost, jelikož recentní studie ukázala, že gradient EGL-20 na dlouhou vzdálenost se utváří extracelulární disperzí a ne endocytózou (Pani & Goldstein, 2018). Teoreticky by se však nemuselo jednat o endocytózu přímo EGL-20, ale o endocytózu povrchových molekul, které jsou schopné molekuly Wnt vázat, jako je například syndecan. Vliv SDN-1/syndecan na signalizaci Wnt byl u *C. elegans* popsán (Sundararajan *et al.*, 2015; Saied-Santiago *et al.*, 2017). Avšak ani v případě nadměrné exprese ve svalech nebo epidermis jsme nepozorovali navýšení nebo snížení defektů v migraci PVM při porovnání transgenních jedinců a negativní kontroly. Z výsledků tudíž usuzujeme, že samotná nadprodukce PPK-1 nemá vliv na migraci PVM.

Nicméně nadbytek sledovaného proteinu nemusí být vždy vypovídající, a naopak je ve většině případů biologicky významné, pokud dojde k absenci exprese sledovaného proteinu. Tuto možnost jsme se rozhodli otestovat pomocí tkáňově specifické degradace. Pro tento postup jsme zvolili metodu AID, jejíž výhodou je nejen místně lokalizované zacílení degradace v závislosti na použitém promotoru, ale také umožňuje obnovit expresi proteinu po odstranění auxinu. Výhodou také je, že umožňuje i studium proteinů, jejichž absence vede k embryonální letalitě (Zhang *et al.*, 2015). Naopak nevýhodou je náročnější postup přípravy, který zahrnuje

jak přípravu linie exprimující TIR1 v příslušných buňkách, tak zejména přípravu linie nesoucí sledovaný gen (*ppk-1*) označený degronem AID.

Linii nesoucí konstrukt *egl-20p::TIR1* jsme měli již připravenou a ověřenou z předchozích pokusů. Věnovali jsme se proto přípravě linie pro expresi proteinu TIR1 v přijímajících buňkách, a to pod kontrolou *wrt-2p*, jehož účinnost jsme si otestovali během pokusů s nadměrnou produkcí PPK-1. Účinnost připraveného konstruktu jsme ověřili se známým členem signální dráhy proteinu Wnt, konkrétně MIG-5/Dvl. Tento protein se účastní přenosu signálu v buňce přijímající signál Wnt, kde má kritickou úlohu v inhibici destrukčního komplexu (Walston *et al.*, 2006). Očekávali jsme, že pokud je vytvořený konstrukt *wrt-2p::TIR1* správně připravený, tak dojde po injekci tohoto vektoru do linie *mig-5::AID* k projevení fenotypu QL po ošetření auxinem. Přestože jsme u vytvořené linie nepozorovali úbytek zelené fluorescence značící přítomnost MIG-5 (jenž byl označený GFP), jak bylo pozorováno v původní studii (Zhang *et al.*, 2015), tak jsme ale pozorovali 70% nárůst v penetranci fenotypu QL. Nicméně fluorescenci MIG-5 jsme špatně detekovali již v negativní kontrole, proto usuzujeme, že je degradace účinná.

V žádném z provedených pokusů nebyla penetrance fenotypu QL úplná, přestože ztráta funkce MIG-5 způsobená mutací v genu vede ke 100% penetranci (Walston *et al.*, 2006). Tak vysoké penetrance ale nebylo dosaženo ani s kontrolní linií, kde byl TIR1 exprimován ve všech buňkách, nikoliv pouze v buňkách přijímajících Wnt, neúplnou penetranci tak nelze přičítat nesprávnému fungování linie nesoucí *wrt-2p::TIR1*. Neúplná penetrance by se dala vysvětlit tím, že u některých jedinců i po ošetření auxinem zůstává nízká hladina nedegradovaného proteinu MIG-5, která je dostačující pro správnou transdukcí signálu a výslednou migraci QL. To, že pro správnou transdukcí postačují nízké hladiny MIG-5 bylo již dříve prokázáno (Walston *et al.*, 2006). Dalším možným vysvětlením neúplné penetrance by mohl být fakt, že protein TIR1 je exprimován z extrachromozomálního konstrukt, který se dědí náhodně a nemusí být přítomen ve všech buňkách jedince (Mello *et al.*, 1991).

Důvodem by také mohlo být špatné načasování ošetření auxinem, nicméně tuto možnost jsme vyloučili. Sice je migrace QL závislá na MIG-5 pouze v krátkém časovém úseku (1-4 hod) po vylíhnutí z embrya, v tak zvaném L1 stádiu, ale autoři metody pozorují úplnou degradaci proteinu již po 20-30 minutách po přidání auxinu (Zhang *et al.*, 2015). Možný vliv nesprávného načasování jsme eliminovali tím, že jsme na auxinové misky přendali již gravidní háďátka, tudíž byli nově vylíhlí jedinci ihned vystaveni auxinu a degradace tak byla umožněna ve správném časovém úseku.

Během přípravy linie nesoucí *ppk-1* označený degronem AID jsme narazili na několik komplikací. Již při syntéze homologních ramen potřebných pro metodu CRISPR/Cas9 jsme narazili na problémy, kdy se nepodařilo naamplifikovat ramena v optimální délce. Museli jsme prodloužit délku ramen oproti doporučenému rozsahu (Dickinson *et al.*, 2015), což by teoreticky mohlo ovlivnit účinnost homologní rekombinace. Výsledné konstrukty jsme injikovali do živých jedinců *C. elegans*, nicméně po ošetření hygromycinem, který slouží jako jeden ze selekčních znaků, všechna hád'átka umřela.

Prvním možným vysvětlením nezdařeného pokusu by mohl být problém s injekcemi. Publikovaná metoda připouští relativně nízkou účinnost a je doporučeno nainjikovat 50-60 jedinců (Dickinson *et al.*, 2015). Nám se ovšem podařilo úspěšně nainjikovat 70-80 jedinců, bohužel bez požadovaného výsledku. Dalším problémem s injekcemi byl, že v době přípravy tohoto konstruktu došlo v naší laboratoři k celkovému snížení účinnosti injekcí i s řadou dalších konstruktů nevyužívajících technologie CRISPR/Cas9, kde by účinnost transgeneze měla být řádově vyšší (Mello *et al.*, 1991). Proto jsme provedli eliminaci vnějších faktorů jako je například čistota DNA (Mello & Fire, 1995), kdy jsme znovu připravili komponenty potřebné pro směs plazmidů k injekci. Navíc jsme nově rozmrazili kmen, do něhož jsme injekce prováděli. Při mikroinjekcích provedených pro získání nadměrné produkce PPK-1 se naštěstí účinnost navrátila do původních hodnot. Tudíž jsme po opětovných injekcích, které měly stejný nezdařilý výsledek, tuto možnost zavrhlí jako hlavní zdroj nezdaru a zaměřili se na jiné faktory.

Další možností by mohlo být správné načasování přidání hygromycinu. U injikovaných jedinců musí dojít ke zlomu v jaderné DNA a následné opravě homologní rekombinací, což vyžaduje čas. Selekční antibiotikum se přidávalo 2.-3. den od injekce, kdy nainjikovaní jedinci zvládnou naklást embrya, která stihnou vývoj do L1-2 stádia, v kterém by měla být dokončena oprava jaderného zlomu. Nicméně oproti původnímu protokolu, v kterém kultivují hád'átka ve 25 °C (Dickinson *et al.*, 2015), se v našich experimentech hád'átka kultivovala v 20 °C, což v porovnání ústí k pomalejšímu životnímu cyklu. Proto jsme se pro ošetření F1 generace hygromycinem nespolehali na dny od injekce, ale na vývojové stádium, v kterém se generace F1 nacházela. Avšak i v tomto případě generace F1 umírala po ošetření hygromycinem.

Kromě těchto problémů by dalším vysvětlením mohl být špatně sestavený vektor obsahující selekční kazetu, AID degron a homologní ramena pro *ppk-1*. Nicméně po každém kroku jednotlivých fází přípravy jsme konstrukt ověřili sekvenováním DNA a konstrukt by tak měl být sestaven správně. Dalším faktorem, který jsme se rozhodli eliminovat, byl možný nedokonalý přepis naváděcí RNA a proteinu Cas9 z vneseného plazmidu. Připravili jsme proto PCR templát pro novou *ppk-1* sgRNA, který jsme následně využili pro transkripci *in vitro*. Pro

injekci jsme využili takto připravenou sgRNA a již hotový protein Cas9. Nicméně i v tomto případě docházelo k úmrtí hád'átek po ošetření hygromycinem. Nejpravděpodobnějším vysvětlením tedy je, že jsme zvolili špatnou *ppk-1* sgRNA. Bohužel jsme z časových důvodů nebyli schopni testovat další sgRNA a ověřit tak tuto možnost.

I přes naše velké úsilí nám metoda AID nepomohla k určení vlivu PPK-1 na regulaci signální dráhy proteinu Wnt. Nicméně po optimalizaci se může stát silným nástrojem pro studium v naší laboratoři a mohla by být rozhodující metodou pro určení mechanismu zapojení PPK-1 do regulace signalizace Wnt.

5.3. Vliv PPK-1 na časnou polarizaci a migraci neuroblastu QL

Experimenty ověřující vliv *ppk-1* na regulaci signální dráhy proteinu Wnt ukázaly, že v různých mutantních pozadích dochází k narušené migraci neuroblastu QL. Jelikož se nám nepodařilo zjistit mechanismus, kterým by PPK-1 mohla ovlivňovat signalizaci Wnt řídící pozdější fázi migrace QL, rozhodli jsme se ověřit také alternativní hypotézu, podle které by PPK-1 měla funkci v časné polarizaci a migraci QL. Tento raný děj odehrávající se jen několik hodin po vylíhnutí embrya je zatím málo prozkoumaný, i když jsou známy některé komponenty mající vliv na tento časný vývoj. Mezi identifikované proteiny účastníci se iniciační fáze migrace patří DPY-19, MIG-21 nebo UNC-40 (Honigberg & Kenyon, 2000; Middelkoop *et al.*, 2012; Sundararajan & Lundquist, 2012). Tyto proteiny jsou stejně jako sledovaná kináza PPK-1 lokalizovány na plazmatické membráně. Umístění proteinů ve specifické oblasti membrány v určitý čas může hrát zásadní roli v mnoha buněčných dějích, jako je například polarizace. Bylo ukázáno, že obohacení PPK-1 v posteriorní části jednobuněčného embrya vede k rozdělení tažných sil dělicího vřeténka a tím k asymetrickému dělení buňky (Panbianco *et al.*, 2008).

Savčí homolog PPK-1 byl také pozorován v membránových výběžcích a některé práce naznačují, že různé stimuly mohou aktivovat různé izoformy PIP5K a vést k řízené migraci buněk prostřednictvím ovlivnění aktinového cytoskeletu. Například PIP5K γ je rekrutována do membránových zvlnění, čímž se zvýší hladiny PI(4,5)P₂ v reakci na EGF (Sun *et al.*, 2008). Podobně odpovídá i PIP5K α , která navíc reaguje i na stimulaci PDGF (Doughman *et al.*, 2003). Je proto představitelné, že by PPK-1 mohla prostřednictvím asymetrické lokalizace a produkce PI(4,5)P₂ regulovat aktinový cytoskelet buňky QL a tím ovlivňovat její polarizovanou migraci.

Pro ověření vlivu *ppk-1* na iniciační fázi migrace QL jsme použili kmen nesoucí transgen *heIs63*, který umožní vizualizovat jádra a doménu PH v plazmatické membráně

hypodermálních buněk V1-V6 a QL. Tento transgen byl exprimován v mutantním pozadí *vps-29*, u něhož jsme pozorovali po RNAi s *ppk-1* nárůst jedinců s fenotypem QL. Očekávali jsme, že pokud má PPK-1 funkci v časně polarizaci a migraci QL, tak po RNAi s *ppk-1* dojde k počáteční migraci QL směrem k anterioru místo posteriorním směrem, případně že QL zcela ztratí schopnost polarizace. Nicméně k defektní migraci nedošlo. Tyto výsledky naznačují, že PPK-1 ovlivňuje migraci neuroblastu QL spíše až v pozdější fázi závislé na signální dráze Wnt.

Tento experiment nicméně přinesl ještě jeden důležitý poznatek. Pro sledování polarizace QL byl využit transgen exprimující doménu PH pocházející z fosfolipázy C18 (Wildwater *et al.*, 2011), která rozpoznává PI(4,5)P2. Transgen tak mohl rovněž sloužit jako sonda pro sledování hladiny PI(4,5)P2. Očekávali jsme, že po RNAi s *ppk-1* by mohlo dojít k poklesu vazby GFP-PH na plazmatickou membránu, nic takového jsme však nepozorovali. To by mohlo znamenat, že RNAi není dostatečně účinná a že k žádnému poklesu hladiny PI(4,5)P2 nedochází, nicméně vzhledem k tomu, že pozorujeme výrazný fenotyp QL po RNAi s *ppk-1* v pozadí *vps-29*, předpokládáme, že k nějakému poklesu dochází. Problémem transgenu by mohlo být, že z něj dochází k vysoké nadprodukci GFP-PH a případný pokles vazby na membránu tak není jednoduše detekovatelný.

Celkově však z experimentů vyplývá, že pro další studium je naprosto klíčové pokusit se získat linii pro cílenou degradaci PPK-1, která by měla umožnit zásadní snížení hladiny proteinu a tím také jednoznačnější výsledky.

5.4. Působení PPK-1 na ostatní ligandy Wnt u *C. elegans*

Dosud diskutované výsledky sledovaly vývoj QL, což je jedna z mnoha možností, jak lze studovat signalizaci Wnt u *C. elegans* v postembryonálním vývoji. Tento buněčný děj je však primárně závislý jen na jednom (EGL-20) z pěti identifikovaných proteinů homologních pro savčí ligand Wnt. Proto jsme se v poslední části této práce zaměřili i na vývojové procesy řízené signální dráhou proteinu Wnt využívající i jiné ligandy Wnt, jež by nám umožnily zjistit, nakolik je vliv *ppk-1* na signalizaci Wnt univerzální.

Jako první jsme zvolili analýzu, která sleduje polaritu axonů u ALM a PLM neuronů, jejichž orientace závisí hned na několika ligandech Wnt. Polaritu ALM ovlivňuje trojice CWN-1, CWN-2 a EGL-20, naopak na polaritě PLM se podílí CWN-1, EGL-20 a LIN-44 (Pan *et al.*, 2006; Prasad & Clark, 2006; Hilliard & Bargmann, 2006). Očekávali jsme, že pokud má PPK-1 vliv i na jiné ligandy, a nejen na již testovaný EGL-20, tak se projeví defektní vývoj ALM či PLM. Opět jsme provedli experimenty s RNAi, v nichž jsme snížili expresi *ppk-1* v různých

mutantních pozadích. Ze všech testovaných mutantních kmenů došlo k defektnímu vývoji ALM nebo PLM pouze u *mig-14(mu71)*, kde jsme pozorovali signifikantní navýšení penetrance u zmíněných fenotypů.

Alela *mu71* představuje alelu produkující protein MIG-14/Wls se sníženou funkcí, nikoliv zcela nefunkční protein, kde pravděpodobně stále dochází k určité míře sekrece proteinů Wnt (Yang *et al.*, 2008), nicméně z testovaných mutantních pozadí je to linie s nejnižší hladinou Wnt. Pro správnou polarizaci ALM a PLM je zřejmě dostačující nižší hladina proteinů Wnt než například pro migraci QL, navíc se jednotlivé ligandy Wnt mohou vzájemně zastoupit (Prasad & Clark, 2006). Proto se alespoň částečná penetrance fenotypu ALM a PLM projeví jen v případě *mig-14(mu71)* a nikoliv například v pozadí *vps-29*, kde je zachována částečná funkce retromerového komplexu a tak i produkce proteinů Wnt (Coudreuse *et al.*, 2006; Prasad & Clark, 2006). Jakýkoliv další zásah do signalizace Wnt, v našem případě RNAi s *ppk-1*, se tak negativně projevil jen v případě mutantního pozadí *mig-14*, v dalších případech byla zřejmě i po RNAi s *ppk-1* úroveň signalizace dostatečně vysoká pro správnou polarizaci ALM a PLM.

Jako další příklad signální dráhy proteinu Wnt jsme zvolili tu, která je závislá pouze na jednom ligandu Wnt, konkrétně na LIN-44, regulující polaritu dělení buněk T (Herman *et al.*, 1995). Po provedení RNAi s *ppk-1* došlo u mutantů v *mig-14* i *vps-29* k signifikantnímu navýšení počtu špatně vyvinutých T.paa a T.pap, jenž tvoří propojující kanál mezi phasmidy a vnějším okolím. Z těchto výsledků lze usoudit, že PPK-1 ovlivňuje i signalizaci Wnt závislou na LIN-44.

Analýza neuronů ALM a PLM a asymetrického dělení buňky T ukázala, že PPK-1 se podílí na regulaci signální dráhy proteinu Wnt řízené nejméně dvěma z pěti homologů pro ligand Wnt, konkrétně EGL-20 a LIN-44, a potvrdila tak naši teorii, že PPK-1 patří mezi modulátory této konzervativní signální dráhy. Přesný mechanismus zapojení PPK-1 do regulace se nám však odhalit nepodařilo.

6. Závěr

Je překvapivé, že funkce tak zásadního proteinu jako je PPK-1, který je nezbytný pro produkci PI(4,5)P₂ u *C. elegans*, zůstává u tohoto organismu téměř neprozkoumaná. V této práci jsme se pokusili objasnit vliv PPK-1 na regulaci kanonické signální dráhy Wnt a přispět tak k lepšímu porozumění funkce této kinázy na jedné straně a mechanismu regulace signální dráhy Wnt na straně druhé. Prostřednictvím experimentů s RNAi jsme byli schopni odhalit některé genetické interakce *ppk-1* s komponenty podílejícími se na recyklaci MIG-14/Wls z plazmatické membrány a potvrdit tak účast *ppk-1* v regulaci signalizace Wnt.

Použitím tkáňově specifické nadprodukce jsme chtěli určit možnou oblast působení PPK-1. Na základě výsledků provedených pokusů jsme ale nebyli schopni stanovit, zda se jedná o buňky produkující nebo přijímající EGL-20/Wnt. Ověřili jsme si i možnost zapojení do transportu mezi produkujícími a přijímajícími buňkami pro případ, že by se PPK-1 podílela na formování gradientu, ale také bez úspěchu. Z našich výsledků vyplynulo, že nadměrná produkce PPK-1 nemá vliv na migraci PVM z QL dceřiných buněk, nejviditelnějšího projevu aktivace kanonické dráhy Wnt. Bohužel ani opačným přístupem, tkáňově specifickou degradací, jsme nebyli schopni ověřit navrhované mechanismy, a to zejména kvůli technickým potížím s použitou metodou AID.

Nenašli jsme ale žádné důkazy podporující alternativní hypotézu o vlivu PPK-1 na časnou migraci a polarizaci QL, to tedy naznačuje, že se PPK-1 spíše podílí až na pozdější fázi regulace neuroblastu QL, která je řízena signální dráhou Wnt. V poslední části naší práce jsme odhalili vliv PPK-1 na signalizaci Wnt řízenou nejen EGL-20/Wnt, ale i LIN-44/Wnt. Můžeme tedy říct, že PPK-1 se podílí na regulaci více typů signálních drah proteinu Wnt dosud neidentifikovaným mechanismem. Bylo by jistě zajímavé ověřit účinek PPK-1 i na další homology pro Wnt a rozšířit tak spektrum vlivu PPK-1.

Další experimenty jsou zapotřebí pro úplné porozumění funkce PPK-1 v regulaci signální dráhy proteinu Wnt u *C. elegans*. Zásadním nástrojem pro další práci je kmen umožňující cílené snižování exprese *ppk-1* jen ve vybraných tkáních. Pro optimalizaci metody AID bude pravděpodobně zásadní provést nové pokusy s jinou naváděcí RNA pro CRISPR/Cas9, což by mohlo vést k úspěšnému vnesení degronu AID a následným experimentům s cílenou degradací PPK-1. Pro určení role PPK-1 buď v buňkách produkujících nebo přijímajících signál Wnt bude tento nástroj nezbytný.

7. Seznam literatury

- Achiriloaie M, Barylko B & Albanesi JP (1999) Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor- mediated endocytosis. *Molecular and cellular biology* 19: 1410–1415
- Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S & Bernfield M (2000) Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nature Genetics* 25: 329–332
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y & Alkalay I (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & Development* 16: 1066–1076
- Ashley GE, Duong T, Levenson MT, Martinez MAQ, Johnson LC, Hibshman JD, Saeger HN, Palmisano NJ, Doonan R, Martinez-Mendez R, *et al.* (2021) An expanded auxin-inducible degron toolkit for *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 217: iyab006
- Asikainen S, Vartiainen S, Lakso M, Nass R & Wong G (2005) Selective sensitivity of *Caenorhabditis elegans* neurons to RNA interference. *Neuroreport* 16: 1995–1999
- Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT & Perrimon N (1998) Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes & Development* 12: 2610–2622
- Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A & Aaronson SA (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nature Cell Biology* 3: 683–686
- Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G & Basler K (2006) Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125: 509–522
- Barnes MR, Duckworth DM & Beeley LJ (1998) Frizzled proteins constitute a novel family of G protein-coupled receptors, most closely related to the secretin family. *Trends in Pharmacological Sciences* 19: 399–400
- Barsukov I, Prescott A, Bate N, Patel B, Floyd D, Bhanji N, Bagshaw CR, Letinic K, Paolo GD, Camilli PD, *et al.* (2003) Phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 γ and β 1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *The Journal of biological chemistry* 278: 31202–31209
- Behrens J, Jerchow B-A, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kühl M, Wedlich D & Birchmeier W (1998) Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with β -Catenin, APC, and GSK3 β . *Science* 280: 596–599
- Belenkaya TY, Wu Y, Tang X, Zhou B, Cheng L, Sharma YV, Yan D, Selva EM & Lin X (2008) The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Developmental Cell* 14: 120–131
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J & Nusse R (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382: 225–230

- Burda P, Padilla SM, Sarkar S & Emr SD (2002) Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *Journal of Cell Science* 115: 3889-3900
- Cabrera CV, Alonso MC, Johnston P, Phillips RG & Lawrence PA (1987) Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* 50: 659-663
- Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M & Bejsovec A (1998) Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395: 604-608
- Chalfie M & Sulston J (1981) Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 82: 358-370
- Chen S, Bubeck D, MacDonald BT, Liang W-X, Mao J-H, Malinauskas T, Llorca O, Aricescu AR, Siebold C, He X, *et al.* (2011) Structural and Functional Studies of LRP6 Ectodomain Reveal a Platform for Wnt Signaling. *Developmental Cell* 21: 848-861
- Chia IV & Costantini F (2005) Mouse Axin and Axin2/Conductin Proteins Are Functionally Equivalent In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* 25: 4371-4376
- Ch'ng Q, Williams L, Lie YS, Sym M, Whangbo J & Kenyon C (2003) Identification of genes that regulate a left-right asymmetric neuronal migration in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 164: 1355-1367
- Coudreuse DYM, Roël G, Betist MC, Destrée O & Korswagen HC (2006) Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science* 312: 921-924
- Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Lüthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, *et al.* (1999) Essential Role of Phosphoinositide Metabolism in Synaptic Vesicle Recycling. *Cell* 99: 179-188
- Cullen PJ (2008) Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 574-582 **Review**
- Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A & Niehrs C (2005) Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438: 867-872
- Di Paolo G, Pellegrini L, Letinic K, Cestra G, Zoncu R, Voronov S, Chang S, Guo J, Wenk MR & De Camilli P (2002) Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature* 420: 85-89
- Dickinson DJ, Pani AM, Heppert JK, Higgins CD & Goldstein B (2015) Streamlined Genome Engineering with a Self-Excising Drug Selection Cassette. *Genetics* 200: 1035-1049
- Dickinson DJ, Ward JD, Reiner DJ & Goldstein B (2013) Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nature Methods* 10: 1028-1034
- Doughman RL, Firestone AJ, Wojtasiak ML, Bunce MW & Anderson RA (2003) Membrane ruffling requires coordination between type Ialpha phosphatidylinositol phosphate kinase and Rac signaling. *The Journal of biological chemistry* 278: 23036-23045
- Dreier L, Burbea M & Kaplan JM (2005) LIN-23-mediated degradation of beta-catenin regulates the abundance of GLR-1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *C. elegans*. *Neuron* 46: 51-64

- Duncan RN, Panahi S, Piotrowski T & Dorsky RI (2015) Identification of Wnt Genes Expressed in Neural Progenitor Zones during Zebrafish Brain Development. *PLOS ONE* 10: e0145810
- Eisenmann DM, Maloof JN, Simske JS, Kenyon C & Kim SK (1998) The beta-catenin homolog BAR-1 and LET-60 Ras coordinately regulate the Hox gene *lin-39* during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Development* 125: 3667–3680
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811
- Flack JE, Mieszczanek J, Novcic N & Bienz M (2017) Wnt-Dependent Inactivation of the Groucho/TLE Co-repressor by the HECT E3 Ubiquitin Ligase Hyd/UBR5. *Molecular Cell* 67: 181–193
- Franch-Marro X, Wendler F, Guidato S, Griffith J, Baena-Lopez A, Itasaki N, Maurice MM & Vincent J-P (2008) Wingless secretion requires endosome-to-Golgi retrieval of Wntless/Evi/Sprinter by the retromer complex. *Nature Cell Biology* 10: 170–177
- Gallon M & Cullen PJ (2015) Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochemical Society Transactions* 43: 33–47 **Review**
- Gasnereau I, Herr P, Chia PZC, Basler K & Gleeson PA (2011) Identification of an endocytosis motif in an intracellular loop of Wntless protein, essential for its recycling and the control of Wnt protein signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 43324–43333
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA & Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6: 343–345
- Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG & Stenmark H (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *The EMBO Journal* 19: 4577–4588
- Glaeser K, Urban M, Fenech E, Voloshanenko O, Kranz D, Lari F, Christianson JC & Boutros M (2018) ERAD-dependent control of the Wnt secretory factor Evi. *The EMBO Journal* 37: e97311
- Gleason JE, Szyleyko EA & Eisenmann DM (2006) Multiple redundant Wnt signaling components function in two processes during *C. elegans* vulval development. *Developmental Biology* 298: 442–457
- Greco V, Hannus M & Eaton S (2001) Argosomes: A Potential Vehicle for the Spread of Morphogens through Epithelia. *Cell* 106: 633–645
- Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K & Boutros M (2012) Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology* 14: 1036–1045
- Hávová D, Analysis of casein kinase γ function in model organism *Caenorhabditis elegans*. Praha 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Macůrková M
- Habas R & Dawid IB (2005) Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of Biology* 4: 2 **Review**
- Haft CR, de la Luz Sierra M, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA & Taylor SI (2000) Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Molecular Biology of the Cell* 11: 4105–4116

- Harris J, Honigberg L, Robinson N & Kenyon C (1996) Neuronal cell migration in *C. elegans*: regulation of Hox gene expression and cell position. *Development* 122: 3117–3131
- Hart M, Concordet J-P, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, *et al.* (1999) The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Current Biology* 9: 207–211
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B & Polakis P (1998) Downregulation of β -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . *Current Biology* 8: 573–581
- Harterink M, Port F, Lorenowicz MJ, McGough IJ, Silhankova M, Betist MC, van Weering JRT, van Heesbeen RGHP, Middelkoop TC, Basler K, *et al.* (2011) A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nature Cell Biology* 13: 914–923
- Heppert JK, Pani AM, Roberts AM, Dickinson DJ & Goldstein B (2018) A CRISPR Tagging-Based Screen Reveals Localized Players in Wnt-Directed Asymmetric Cell Division. *Genetics* 208: 1147–1164
- Herman MA, Vassilieva LL, Horvitz HR, Shaw JE & Herman RK (1995) The *C. elegans* gene *lin-44*, which controls the polarity of certain asymmetric cell divisions, encodes a Wnt protein and acts cell nonautonomously. *Cell* 83: 101–110
- Herr P & Basler K (2012) Porcupine-mediated lipidation is required for Wnt recognition by Wls. *Developmental Biology* 361: 392–402
- Hilliard MA & Bargmann CI (2006) Wnt signals and frizzled activity orient anterior-posterior axon outgrowth in *C. elegans*. *Developmental Cell* 10: 379–390
- Holzer T, Liffers K, Rahm K, Trageser B, Özbek S & Gradl D (2012) Live imaging of active fluorophore labelled Wnt proteins. *FEBS Letters* 586: 1638–1644
- Honigberg L & Kenyon C (2000) Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development* 127: 4655–4668
- Hsieh J-C, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB & Nathans J (1999) A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398: 431–436
- Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ & Weis WI (2001) The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 12301–12309
- Inglis PN, Ou G, Leroux MR & Scholey JM (2018) The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: the online review of C elegans biology*: 1–22 **Review**
- Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Katagiri H, Yazaki Y, Asano T & Oka Y (1996) Cloning of cDNAs Encoding Two Isoforms of 68-kDa Type I Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271: 23611–23614
- Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y, Asano T & Oka Y (1998) Type I Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-Kinases: Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *Journal of Biological Chemistry* 273: 8741–8748

- Jackson BM & Eisenmann DM (2012) β -Catenin-Dependent Wnt Signaling in *C. elegans*: Teaching an Old Dog a New Trick. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a007948 **Review**
- Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA & Schmid SL (1998) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Current biology* 8: 1399-1402
- Kadowaki T, Wilder E, Klingensmith J, Zachary K & Perrimon N (1996) The segment polarity gene *porcupine* encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes & Development* 10: 3116–3128
- Kaiser K, Gyllborg D, Procházka J, Salašová A, Kompaníková P, Molina FL, Laguna-Goya R, Radaszkiewicz T, Harnoš J, Procházková M, *et al.* (2019) WNT5A is transported via lipoprotein particles in the cerebrospinal fluid to regulate hindbrain morphogenesis. *Nature Communications* 10: 1498
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG & Ahringer J (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology* 2: 25–34
- Katan M & Cockcroft S (2020) Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate: Diverse functions at the plasma membrane. *Essays in Biochemistry* 64: 513–531 **Review**
- Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P & Markham A (1991) Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251: 1366–1370
- Kirkpatrick CA & Selleck SB (2007) Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *Journal of Cell Science* 120: 1829–1832 **Review**
- Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M & Kikuchi A (1999) DIX Domains of Dvl and Axin Are Necessary for Protein Interactions and Their Ability To Regulate β -Catenin Stability. *Molecular and Cellular Biology* 19: 4414–4422
- Klingensmith J, Nusse R & Perrimon N (1994) The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes & Development* 8: 118–130
- Komekado H, Yamamoto H, Chiba T & Kikuchi A (2007) Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 12: 521–534
- Komiya Y & Habas R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4: 68–75 **Review**
- Koo B-K, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, van Es JH, Mohammed S, Heck AJR, Maurice MM, *et al.* (2012) Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488: 665–669
- Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R, Gherbesi N & Budnik V (2009) Trans Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless. *Cell* 139: 393–404
- Korswagen HC, Coudreuse DYM, Betist MC, van de Water S, Zivkovic D & Clevers HC (2002) The Axin-like protein PRY-1 is a negative regulator of a canonical Wnt pathway in *C. elegans*. *Genes & Development* 16: 1291–1302

- Korswagen HC, Herman MA & Clevers HC (2000) Distinct β -catenins mediate adhesion and signalling functions in *C. elegans*. *Nature* 406: 527–532
- Krasnow RE, Wong LL & Adler PN (1995) Dishevelled is a component of the frizzled signaling pathway in *Drosophila*. *Development* 121: 4095–4102
- Krauss M, Kukhtina V, Pechstein A & Haucke V (2006) Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate synthesis by AP-2mu-cargo complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11934–11939
- Kunz J, Fuelling A, Kolbe L & Anderson RA (2002) Stereo-specific Substrate Recognition by Phosphatidylinositol Phosphate Kinases Is Swapped by Changing a Single Amino Acid Residue. *Journal of Biological Chemistry* 277: 5611–5619
- Kunz J, Wilson MP, Kisseleva M, Hurley JH, Majerus PW & Anderson RA (2000) The activation loop of phosphatidylinositol phosphate kinases determines signaling specificity. *Molecular Cell* 5: 1–11
- Lam AK & Phillips BT (2017) Wnt signaling polarizes *C. elegans* asymmetric cell divisions during development. *Results and problems in cell differentiation* 61: 83–114 **Review**
- Lambrechts A, Jonckheere V, Dewitte D, Vandekerckhove J & Ampe C (2002) Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochemistry* 3: 12
- Lee HK, Chaboub LS, Zhu W, Zollinger D, Rasband MN, Fancy SPJ & Deneen B (2015) Daam2-PIP5K Is a Regulatory Pathway for Wnt Signaling and Therapeutic Target for Remyelination in the CNS. *Neuron* 85: 1227–1243
- Lemmon MA (2003) Phosphoinositide Recognition Domains. *Traffic* 4: 201–213 **Review**
- Leyns L, Bouwmeester T, Kim S-H, Piccolo S & De Robertis EM (1997) Frzb-1 Is a Secreted Antagonist of Wnt Signaling Expressed in the Spemann Organizer. *Cell* 88: 747–756
- Lin R, Thompson S & Priess JR (1995) pop-1 encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* 83: 599–609
- Ling K, Bairstow SF, Carbonara C, Turbin DA, Huntsman DG & Anderson RA (2007) Type I γ phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with μ 1B adaptin. *The Journal of Cell Biology* 176: 343–353
- Ling K, Doughman RL, Firestone AJ, Bunce MW & Anderson RA (2002) Type I γ phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* 420: 89–93
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, Zhang Z, Lin X & He X (2002) Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108: 837–847
- Logan CY & Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 781–810 **Review**
- Loh KM, van Amerongen R & Nusse R (2016) Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. *Developmental Cell* 38: 643–655 **Review**

- Loijens JC & Anderson RA (1996) Type I Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinases Are Distinct Members of This Novel Lipid Kinase Family. *Journal of Biological Chemistry* 271: 32937-32943
- Lu W, Yamamoto V, Ortega B & Baltimore D (2004) Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119: 97–108
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, *et al.* (2002) Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Molecular and Cellular Biology* 22: 1184–1193
- Luz M, Spann-Müller S, Özhan G, Kagermeier-Schenk B, Rhinn M, Weidinger G & Brand M (2014) Dynamic Association with Donor Cell Filopodia and Lipid-Modification Are Essential Features of Wnt8a during Patterning of the Zebrafish Neuroectoderm. *PLOS ONE* 9: e84922
- Maloof JN, Whangbo J, Harris JM, Jongeward GD & Kenyon C (1999) A Wnt signaling pathway controls hox gene expression and neuroblast migration in *C. elegans*. *Development* 126: 37-49
- Medina A, Reintsch W & Steinbeisser H (2000) *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mechanisms of Development* 92: 227–237
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D & Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *The EMBO Journal* 10: 3959–3970
- Mello C & Fire A (1995) Chapter 19 DNA Transformation. In *Methods in Cell Biology*, Epstein HF & Shakes DC (eds) pp 451–482. Academic Press
- Middelkoop T & Korswagen H (2014) Development and migration of the *C. elegans* Q neuroblasts and their descendants. *WormBook: the online review of C elegans biology*: 1–23 **Review**
- Middelkoop TC, Williams L, Yang P-T, Luchtenberg J, Betist MC, Ji N, van Oudenaarden A, Kenyon C & Korswagen HC (2012) The thrombospondin repeat containing protein MIG-21 controls a left-right asymmetric Wnt signaling response in migrating *C. elegans* neuroblasts. *Developmental Biology* 361: 338–348
- Mii Y & Taira M (2009) Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* 136: 4083–4088
- Miller JR (2001) The Wnts. *Genome Biology* 3: 3001.1–3001.15 **Review**
- Mlodzik M (2002) Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends in genetics* 18: 564–571 **Review**
- Mosimann C, Hausmann G & Basler K (2009) β -Catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 276–286 **Review**
- Mulligan KA, Fuerer C, Ching W, Fish M, Willert K & Nusse R (2012) Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by maintaining Wingless solubility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 370–377

- Natarajan L, Witwer NE & Eisenmann DM (2001) The divergent *Caenorhabditis elegans* beta-catenin proteins BAR-1, WRM-1 and HMP-2 make distinct protein interactions but retain functional redundancy in vivo. *Genetics* 159: 159–172
- Niggli V (2005) Regulation of Protein Activities by Phosphoinositide Phosphates. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 57–79 **Review**
- Nigon VM & Félix M-A (2017) History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook: The Online Review of C Elegans Biology* 2017: 1–84 **Review**
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S & Hedge P (1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253: 665–669
- Nishita M, Yoo SK, Nomachi A, Kani S, Sougawa N, Ohta Y, Takada S, Kikuchi A & Minami Y (2006) Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *The Journal of Cell Biology* 175: 555–562
- Nusse R & Clevers H (2017) Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169: 985–999 **Review**
- Oosterveen T, Coudreuse DYM, Yang P-T, Fraser E, Bergsma J, Dale TC & Korswagen HC (2007) Two functionally distinct Axin-like proteins regulate canonical Wnt signaling in *C. elegans*. *Developmental Biology* 308: 438–448
- Pan C-L, Baum PD, Gu M, Jorgensen EM, Clark SG & Garriga G (2008a) *C. elegans* AP-2 and retromer control Wnt signaling by regulating mig-14/Wntless. *Developmental Cell* 14: 132–139
- Pan C-L, Howell JE, Clark SG, Hilliard M, Cordes S, Bargmann CI & Garriga G (2006) Multiple Wnts and frizzled receptors regulate anteriorly directed cell and growth cone migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell* 10: 367–377
- Pan W, Choi S-C, Wang H, Qin Y, Volpicelli-Daley L, Swan L, Lucast L, Khoo C, Zhang X, Li L, *et al.* (2008b) Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. *Science* 321: 1350–1353
- Pan WJ, Pang SZ, Huang T, Guo HY, Wu D & Li L (2004) Characterization of Function of Three Domains in Dishevelled-1: DEP Domain is Responsible for Membrane Translocation of Dishevelled-1. *Cell Research* 14: 324–330
- Panáková D, Sprong H, Marois E, Thiele C & Eaton S (2005) Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435: 58–65
- Panbianco C, Weinkove D, Zanin E, Jones D, Divecha N, Gotta M & Ahringer J (2008) A casein kinase 1 and PAR proteins regulate asymmetry of a PIP(2) synthesis enzyme for asymmetric spindle positioning. *Developmental Cell* 15: 198–208
- Pani AM & Goldstein B (2018) Direct visualization of a native Wnt in vivo reveals that a long-range Wnt gradient forms by extracellular dispersal. *eLife* 7: e38325
- Paolo GD, Moskowitz HS, Gipson K, Wenk MR, Voronov S, Obayashi M, Flavell R, Fitzsimonds RM, Ryan TA & Camilli PD (2004) Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* 431: 415–422

- Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ & Weis WI (2002) Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 18868–18874
- Pokutta S & Weis WI (2000) Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Molecular Cell* 5: 533–543
- Port F, Kuster M, Herr P, Furger E, Bänziger C, Hausmann G & Basler K (2008) Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless. *Nature Cell Biology* 10: 178–185
- Povelones M & Nusse R (2005) The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling. *The EMBO Journal* 24: 3493–3503
- Prasad B & Clark S (2006) Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*. *Development* 133: 1757–66
- Rameh LE, Tolia KF, Duckworth BC & Cantley LC (1997) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390: 192–196
- Ramírez-Weber F-A & Kornberg TB (1999) Cytonemes: Cellular Processes that Project to the Principal Signaling Center in *Drosophila* Imaginal Discs. *Cell* 97: 599–607
- Rao VD, Misra S, Boronenkov IV, Anderson RA & Hurley JH (1998) Structure of type II beta phosphatidylinositol phosphate kinase: a protein kinase fold flattened for interfacial phosphorylation. *Cell* 94: 829–839
- Rella L, Póvoa EEF & Korswagen HC (2016) The *Caenorhabditis elegans* Q neuroblasts: A powerful system to study cell migration at single-cell resolution in vivo. *Genesis* 54: 198–211 **Review**
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D & Nusse R (1987) The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50: 649–657
- Rohatgi R, Ho HH & Kirschner MW (2000) Mechanism of N-Wasp Activation by Cdc42 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Journal of Cell Biology* 150: 1299–1310
- Routledge D & Scholpp S (2019) Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development* 146: dev176073 **Review**
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S & Polakis P (1996) Binding of GSK3 β to the APC- β -Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly. *Science* 272: 1023–1026
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S & Polakis P (1993) Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262: 1731–1734
- Saied-Santiago K, Townley RA, Attonito JD, da Cunha DS, Díaz-Balzac CA, Tecle E & Bülow HE (2017) Coordination of Heparan Sulfate Proteoglycans with Wnt Signaling To Control Cellular Migrations and Positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 206: 1951–1967
- Salser SJ & Kenyon C (1992) Activation of a *C. elegans* Antennapedia homologue in migrating cells controls their direction of migration. *Nature* 355: 255–258
- Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M & Suzuki A (2009) Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Progress in Lipid Research* 48: 307–343 **Review**

- Sawa H & Korswagen HC (2013) Wnt signaling in *C. elegans*. *WormBook: the online review of C elegans biology*: 1–30 **Review**
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9: 676–682
- Schwarz-Romond T, Metcalfe C & Bienz M (2007) Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *Journal of Cell Science* 120: 2402–2412
- Silhankova M, Port F, Harterink M, Basler K & Korswagen HC (2010) Wnt signalling requires MTM-6 and MTM-9 myotubularin lipid-phosphatase function in Wnt-producing cells. *The EMBO Journal* 29: 4094–4105
- Simmer F, Tijsterman M, Parrish S, Koushika SP, Nonet ML, Fire A, Ahringer J & Plasterk RHA (2002) Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Current biology* 12: 1317–1319
- Skare P & Karlsson R (2002) Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Letters* 522: 119–124
- Stanganello E, Hagemann AIH, Mattes B, Sinner C, Meyen D, Weber S, Schug A, Raz E & Scholpp S (2015) Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nature Communications* 6: 5846
- Steinhart Z & Angers S (2018) Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development* 145: dev146589 **Review**
- Stephens LR, Hughes KT & Irvine RF (1991) Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 351: 33–39
- Sulston JE & Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 56: 110–156
- Sun Y, Ling K, Wagoner MP & Anderson RA (2008) Type Iγ PIP Kinase is Required for EGF-Stimulated Directional Cell Migration. *The FASEB Journal* 22: 442–442
- Sundararajan L & Lundquist EA (2012) Transmembrane Proteins UNC-40/DCC, PTP-3/LAR, and MIG-21 Control Anterior–Posterior Neuroblast Migration with Left–Right Functional Asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 192: 1373–1388
- Sundararajan L, Norris ML & Lundquist EA (2015) SDN-1/Syndecan Acts in Parallel to the Transmembrane Molecule MIG-13 to Promote Anterior Neuroblast Migration. *G3 (Bethesda)* 5: 1567–1574
- Tabara H, Grishok A & Mello CC (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282: 430–431
- Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T & Takada S (2006) Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Developmental Cell* 11: 791–801
- Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z & He X (2004) A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation. *Molecular Cell* 13: 149–156

- Tanneberger K, Pfister AS, Brauburger K, Schneikert J, Hadjihannas MV, Kriz V, Schulte G, Bryja V & Behrens J (2011) Amer1/WTX couples Wnt-induced formation of PtdIns(4,5)P₂ to LRP6 phosphorylation. *The EMBO Journal* 30: 1433–1443
- Tauriello DVF, Jordens I, Kirchner K, Slootstra JW, Kruitwagen T, Bouwman BAM, Noutsou M, Rüdiger SGD, Schwamborn K, Schambony A, *et al.* (2012) Wnt/ β -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 812–820
- Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A & Driscoll M (2000) Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genetics* 24: 180–183
- Timmons L, Court DL & Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103–112
- Ulicna L, Rohozkova J & Hozak P (2018) Multiple Aspects of PIP₂ Involvement in *C. elegans* Gametogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2679
- Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, Martin B, Greene LE & Eisenberg E (1995) Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378: 632–635
- Wallroth A & Haucke V (2018) Phosphoinositide conversion in endocytosis and the endolysosomal system. *The Journal of Biological Chemistry* 293: 1526–1535
- Walston T, Guo C, Proenca R, Wu M, Herman M, Hardin J & Hedgecock E (2006) mig-5/Dsh controls cell fate determination and cell migration in *C. elegans*. *Developmental Biology* 298: 485–497
- Weinkove D, Bastiani M, Chessa TAM, Joshi D, Hauth L, Cooke FT, Divecha N & Schuske K (2008) Overexpression of PPK-1, the *Caenorhabditis elegans* Type I PIP kinase, inhibits growth cone collapse in the developing nervous system and causes axonal degeneration in adults. *Developmental Biology* 313: 384–397
- Wenk MR, Pellegrini L, Klenchin VA, Di Paolo G, Chang S, Daniell L, Arioka M, Martin TF & De Camilli P (2001) PIP Kinase I γ Is the Major PI(4,5)P₂ Synthesizing Enzyme at the Synapse. *Neuron* 32: 79–88
- Whangbo J & Kenyon C (1999) A Wnt Signaling System that Specifies Two Patterns of Cell Migration in *C. elegans*. *Molecular Cell* 4: 851–858
- Whiteford CC, Brearley CA & Ulug ET (1997) Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate defines a novel PI 3-kinase pathway in resting mouse fibroblasts. *The Biochemical Journal* 323: 597–601
- Wildwater M, Sander N, de Vreede G & van den Heuvel S (2011) Cell shape and Wnt signaling redundantly control the division axis of *C. elegans* epithelial stem cells. *Development* 138: 4375–4385
- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ & Harper JW (1999) The SCF β -TRC Pubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes & Development* 13: 270–283
- Wong H-C, Bourdelas A, Krauss A, Lee H-J, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi D-L & Zheng J (2003) Direct Binding of the PDZ Domain of Dishevelled to a Conserved Internal Sequence in the C-Terminal Region of Frizzled. *Molecular Cell* 12: 1251–1260

- Xavier CP, Melikova M, Chuman Y, Üren A, Baljinnyam B & Rubin JS (2014) Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/ β -catenin signaling. *Cellular Signalling* 26: 94–101
- Xu X, Guo H, Wycuff DL & Lee M (2007) Role of phosphatidylinositol-4-phosphate 5' kinase (ppk-1) in ovulation of *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Cell Research* 313: 2465–2475
- Yamamoto H, Awada C, Hanaki H, Sakane H, Tsujimoto I, Takahashi Y, Takao T & Kikuchi A (2013) The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *Journal of Cell Science* 126: 2931–2943
- Yang P-T, Lorenowicz MJ, Silhankova M, Coudreuse DYM, Betist MC & Korswagen HC (2008) Wnt signaling requires retromer-dependent recycling of MIG-14/Wntless in Wnt-producing cells. *Developmental Cell* 14: 140–147
- Yu J, Chia J, Canning CA, Jones CM, Bard FA & Virshup DM (2014) WLS retrograde transport to the endoplasmic reticulum during Wnt secretion. *Developmental Cell* 29: 277–291
- Yu JW & Lemmon MA (2001) All Phox Homology (PX) Domains from *Saccharomyces cerevisiae* Specifically Recognize Phosphatidylinositol 3-Phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 276: 44179–44184
- Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, *et al.* (2008) Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135: 367–375
- Zhang L, Ward JD, Cheng Z & Dernburg AF (2015) The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development* 142: 4374–4384
- Zhang P, Wu Y, Belenkaya TY & Lin X (2011) SNX3 controls Wingless/Wnt secretion through regulating retromer-dependent recycling of Wntless. *Cell Research* 21: 1677–1690